



KPI
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0416246-3

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0416246-3

(22) Data do Depósito: 04/11/2004

(43) Data da Publicação do Pedido: 19/05/2005

(51) Classificação Internacional: A61K 39/008; A61K 39/015; G01N 33/569; A61P 33/02.

(30) Prioridade Unionista: EP PCT/EP03/12421 de 05/11/2003; EP PCT/EP2004/001782 de 23/02/2004.

(54) Título: USOS DE TODAS AS QUATRO HISTONAS DE LEISHMANIA H2A, H2B, H3 OU H4, DE UM VETOR E DE ANTICORPOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E AGENTE OU KIT DIAGNÓSTICO

(73) Titular: C.B.F. LETI, S.L. UNIPERSONAL, Sociedade Anônima Espanhola. Endereço: Calle Del Sol, 5, E-28760 Tres Cantos - Madrid, ESPANHA(ES)

(72) Inventor: MANUEL SOTO ALVAREZ; SALVADOR IBORRA; JOSÉ MARIA REQUENA ROLANIA; CARLOS ALONSO BEDATE.

Código de Controle: 07D13A8A88D23CF2 0ED2E179673089F7

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 15/01/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 15/01/2019

Assinado digitalmente por:

Alexandre Gomes Ciano

Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

“USOS DE TODAS AS QUATRO HISTONAS DE LEISHMANIA H2A, H2B, H3 OU H4, DE UM VETOR E DE ANTICORPOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E AGENTE OU KIT DIAGNÓSTICO”.

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se ao uso de histonas para o tratamento, diagnose ou prevenção de uma doença parasítica. Particularmente, refere-se ao uso de uma ou mais das proteínas de histonas H2A, H2B, H3 ou H4 para estes usos.

Antecedentes da invenção

10 Os protozoários *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatos que infectam células da linhagem de fagócitos mononucleares de seus hospedeiros vertebrados. Estes parasitas são os agentes etiológicos de leishmanioses, um grupo de doenças caracterizado por várias manifestações clínicas em humanos, na faixa de úlceras cutâneas de auto-cicatrização a
15 infecção visceral potencialmente fatal (Herwardt, Lancet (1999), 354: 1191). O desenvolvimento da doença e a difusão da infecção variam amplamente de indivíduo a indivíduo dependendo do antecedente genético e o estado do sistema imune do hospedeiro infectado.

Os modelos de murinos de leishmaniose cutânea foram
20 extensivamente usados para explorar as exigências para vacinação eficaz. A administração de vários antígenos a camundongos codificados em vacinas de DNA, resulta na prevenção da doença em alguns casos (estudado em Handman, Clin. Microbiol. Rev. (2001) 14:229. As vacinações com DNA codificando as proteínas CP63, LACK e PSA-2 protegeram os camundongos
25 de infecção por *L. major* (ver por exemplo Xu et al, Immunology (1995) 84: 173. Além disso, uma imunização com uma combinação de plasmídeos expressando as proteínas LACK, LmST11 e TSA demonstrou ser altamente eficaz contra desafio de baixa dose com *L. major* (Mendez et al, J. Immunol. (2001) 166:5122, enquanto um coquetel de dois plasmídeos codificando as

cisteína proteinases CPa e CPb parcialmente protegeram camundongos BALB/c contra desafio de alta dose com *L. major* (Rafati et al, Vaccine (2001) 19 (25-26): 3369). A maior parte das experiências de proteção são limitadas no nível laboratorial e com modelos animais. Assim, porque se tem poucos estudos no campo em animais hospedeiros reais, não se tem uma prova definitiva de que os candidatos serão vacinas de sucesso.

Deve-se notar que um antígeno que produz um bom título de anticorpo, isto é, que é imunogênico, não está sempre e per se oferecendo proteção contra uma doença.

Ao contrário, apesar de algumas respostas de anticorpo ou celulares contra um antígeno poderem ser associadas com proteção, outras respostas de anticorpo ou celulares contra o antígeno podem estar associadas com susceptibilidade e/ou exacerbação da doença. Além disso, um adjuvante é com frequência necessário para efeito protetor, porque os antígenos sem adjuvante podem produzir uma resposta de anticorpo, mas não oferecem proteção. Ver, por exemplo, Stacey e Blackwell (Infect Immun. 1999 Agosto 57 (8): 3719-26) que registraram que vacinação sub-cutânea de camundongos com antígeno de leishmania solúvel (SLA) apenas, SLA mais alúmen, ou SLA mais não oligodeoxinucleotídeos (ODN) que contém motivos CG imuno-estimulatórios (CpG ODN) resultaram em doença exacerbada comparado com camundongos não vacinados. Os camundongos recebendo SLA mais CpG ODN mostraram um efeito protetor altamente significativo comparado com os camundongos vacinados com SLA e melhoraram a sobrevivência comparado com os camundongos não vacinados.

A diversidade antigênica contra espécies *Leishmania*, implicando epítomos específicos para espécie, podem ser uma armadilha no desenvolvimento de uma vacina com base em antígenos individuais (Handman, 2001, ver supra). As vacinas de DNA conhecidas somente protegem contra as espécies das quais o DNA foi obtido. Melby e colegas

registraram in Infect Immun. (2000) 68: 5595 que a imunização com uma biblioteca de expressão de cDNA e sub-bibliotecas codificando para proteínas de *Leishmania donovani*, protegeram os camundongos contra a forma VL da doença causada por *L. donovani*. Gurunathan et al, J. Exp. Med. (1977) 186: 1137 registraram que a vacinação com DNA codificando o antígeno do parasita LACK imunodominante (homólogo de leishmania de receptores para C quinase ativado) de *L. major* confere proteção contra *Leishmania major*. Melby et al Infect Immun. (2001) 69: 4719 mostram que este antígeno não confere proteção contra *L. infantum* em camundongos. Eles também registraram que apesar da vacina de DNA para *L. donovani* p36 (LACK) ser altamente imunogênica, ela não protege contra leishmaniose visceral experimental. Este fenômeno de que uma molécula imunogênica não confere proteção isto é não leva à depuração de uma infecção ou libera os sintomas clínicos, é um dos desafios de encontrar uma boa vacina. SE uma molécula imunogênica ou antigênica pode sempre dar automaticamente proteção, encontrar uma vacina seria uma tarefa fácil. Descobrir uma vacina que pode ser usada contra mais de uma espécie é um desafio ainda maior.

Descrição Detalhada

A presente invenção refere-se ao uso de muitas das proteínas de histonas H2A, H2B, H3 ou H4 para o tratamento, diagnose ou prevenção de uma doença parasítica. Em uma forma de realização, somente se usa H4. Preferivelmente, duas ou mais das histonas H2A, H2B, H3 ou H4 são usadas. Mais preferivelmente três ou mais destas histonas são usadas, mais preferivelmente todas as quatro histonas H2A, H2B, H3 ou H4 são usadas.

A vantagem da presente invenção é que permite a preparação de um medicamento para o tratamento de um espectro mais amplo de doenças, isto é, um medicamento com especificidade de espécies cruzadas. Em muitas doenças parasíticas, uma vacina criada contra uma espécie específica, somente trabalha contra esta espécie específica. Um exemplo de

uma doença parasítica em que este é o caso é leishmaniose. Atualmente, a doença é controlada por drogas, mas o tratamento não evita a difusão da doença e em muitos casos não é muito eficaz.

Em um aspecto da invenção, as histonas são usadas para a
5 preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de uma
doença parasítica.

Em uma forma de realização da invenção, nesta composição
farmacêutica, cada histona está presente em quantidades equimolares. Isto
significa que, por exemplo, uma preparação farmacêutica compreendendo
10 H2A e H2B compreende X mol/l de H2A e X mol/l de H2B.

Em outra forma de realização da invenção, as histonas na
composição farmacêutica estão presentes em quantidades não equimolares.
Isto significa que uma preparação farmacêutica compreendendo, por exemplo,
histonas H2A, H3 e H4, pode compreender X mol/l de H2A, X mol/l de H3 e
15 Y mol/l de H4, ou por exemplo, X mol/l de H2A, Y mol/l de H3 e Z mol/l de
H4. Em uma forma de realização preferida, a composição farmacêutica é
baseada na histona H4 primariamente.

A composição farmacêutica da invenção pode ser usada para
aumentar a capacidade do sistema imune humano ou animal de combater
20 infecções. Particularmente, pode ser usada para a administração a um
indivíduo humano ou animal. A composição farmacêutica é preferivelmente
administrada parenteralmente, por exemplo por injeção ou infusão por via
intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial ou intralesional. A
composição farmacêutica pode ser combinada com um meio
25 farmaceuticamente aceitável ou veículo de liberação por técnicas
convencionais bem conhecidas na arte. Os métodos para preparar as
composições parenteralmente administráveis são bem conhecidos na arte e
descritos em várias fontes, incluindo, por exemplo, Remington's
Pharmaceutical Sciences, Ed. Ar. Gennaro 20a. ed, 2000, Williams &

Wilkins, PA, USA. A composição farmacêutica é preferivelmente administrada em uma dose terapeuticamente eficaz, isto é, uma que irá aumentar a capacidade do sistema imune humano ou animal de combater infecções.

5 Tem particular interesse a composição farmacêutica que é uma vacina. A vacina pode ser uma à base de proteína . Ela pode compreender uma ou mais, mas preferivelmente duas ou mais das proteínas codificadas pelos genes de histonas H2A, H2B, H3 ou H4. Isto significa que uma vacina de proteína pode ser baseada em por exemplo H2A, H2B e H4, ou por
10 exemplo em H2A, H3 ou H4, ou em H2A e H3 ou somente em H4. Em uma forma de realização preferida,. a vacina é baseada em H4.

A vacina também pode ser uma vacina de DNA que compreende um gene para cada histona que está presente na vacina. Por exemplo, uma vacina de DNA com base em histonas H2A, H2B, H3, pode
15 compreender um gene codificando histona H2A, um gene codificando H3B e um gene codificando histona H3. alternativamente, uma vacina de DNA com base em histonas H2A, H2B, e H3, pode compreender dois genes, um gene que codifica, por exemplo, ambas as histonas H2A e H3 e outro que codifica histona H2B. Ou pode compreender um gene codificando todas as três
20 histonas. Neste pedido, estes genes codificando mais de uma histona são chamados genes quiméricos.

Os genes em uma vacina de DNA de acordo com a presente invenção irá tipicamente estar presente em vetores. Os exemplos de vetores apropriados são bem conhecidos dos versados na arte, ver por exemplo
25 Donnelly et al. Ann. REv. Immunol. (1997), 15: 617 e incluem mas não são limitados a pcDNA3 e pcCMV.

As histonas H2A, H2B, H3 ou H4 são proteínas nucleares bem conservadas e sua sequência é bem conhecida dos versados na arte, ver por exemplo Requena et al. Trends in Parasitol. (2000) 16:246. Assim, para a

preparação de uma composição farmacêutica , as histonas H2A, H2B, H3 ou H4 podem ser obtidas a partir de organismo eucariótico, ser uma planta ou animal, ou ser de mamíferos, répteis, peixe, insetos, ou qualquer outro organismo contendo cromossomos, como protozoários. Preferivelmente, as

5 histonas são obtidas de um organismo que está próximo do organismo causando doença na árvore evolucionária. Assim, de particular interesse como uma fonte de histonas a serem usadas no tratamento de doenças parasíticas como leishmaniose são os protozoários e particularmente membros da família de tripanossomatídeos, como por exemplo plasmódeos, mais particularmente

10 espécies diferentes do protozoário tripanossomático *Leishmania*.

O DNA na vacina pode ser qualquer DNA que é apropriado para a expressão de proteína, por exemplo cDNA ou dsDNA mas não o DNA genômico ou ssDNA. Eles podem ser uma mistura de proteína e DNA, em uma vacina por administração simultânea ou sucessiva de DNA e proteína .

15 Também vacinas de RNA podem ser usadas, apesar de precisarem de estabilizadores para estabilizar o RNA que deve ser administrado.

Existem mais de 20 espécies conhecidas de *Leishmania*, incluindo espécies de subgêneros *Leishmania*, compreendendo o complexo *L. mayor*, o complexo *L. donovani*, incluindo *L. chagasi*, *L. donovani* e *L.*

20 *infantum*, o complexo *L. Mexicana*, incluindo *L. amazonensis* e *L. mexicana*, assim como as sub-espécies *Viannia*, compreendendo o complexo *L. braziliensis*, incluindo *L. braziliensis* e *L. peruviana*, e o complexo *L. guyanensis*, incluindo *L. guyanensis* e *L. panamensis*. As espécies *Plasmodium* de particular interesse são *Plasmodium falciparum* e

25 *Plasmodium vivax*.

Em uma forma de realização da invenção, uma composição farmacêutica compreendendo histonas de uma espécie é usada para a preparação de um medicamento para o tratamento de doença parasítica causada por outra espécie.

Particularmente, *Leishmaniasis* causada por uma espécie do gênero *Leishmania* pode ser tratada usando uma composição farmacêutica com base em histonas de outra espécie *Leishmania*. Em uma forma de realização, *Leishmania* causada por *L. major* é tratada com sucesso com uma

5 composição compreendendo histonas de *L. infantum*.

Alternativamente, outras doenças parasíticas, como malária, podem ser tratadas com sucesso com uma composição farmacêutica à base de histonas de outra espécies, por exemplo com base em duas ou mais das histonas H2A, H2B, H3 ou H4 de *L. infantum*.

10 Em outro aspecto, a invenção provê agentes diagnósticos com base em uma ou mais, mas preferivelmente duas ou mais das histonas H2A, H2B, H3 ou H4. Os agentes diagnósticos podem ser as proteínas de histonas que reconhecem anticorpos presentes no soro de paciente reagindo com algumas ou todas as histonas. Um kit diagnóstico compreendendo as proteínas

15 de histonas da invenção também faz parte da invenção. As proteínas de histonas podem estar em recipientes separados. Além de uma ou mais, mas preferivelmente duas ou mais, das histonas H2A, H2B, H3 ou H4, o kit também pode conter, em um recipiente separado, anticorpos contra estas proteínas, por exemplo para controlar reações.

20 Em outro aspecto, a invenção provê um método para evitar a doença parasítica por funcionamento com uma vacina terapêutica. Tipicamente, existe um período de tempo entre a infecção e a doença. Neste caso, a vacina pode atuar como um produto imune farmacológico que iria curar a doença ao elicitar, no hospedeiro, uma resposta imune que impede o

25 efeito patológico da infecção. Uma vacina terapêutica difere de uma vacina profilática em que a vacina terapêutica irá induzir proteção em um paciente que já tem a infecção ou a doença.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1

(A) Proteção em camundongos vacinados com três doses de poças de genes de histonas. Camundongos BALB/C inoculados com genes histona *Leishmania* e controle (pcDNA3 ou PBS) foram desafiados com 5×10^4 promastigotos de *L. major* injetados na almofada da pata traseira esquerda. O intumescimento da almofada da pata é dado como a diferença entre a espessura da almofada da pata infectada versus não infectada contralateral. As medidas de almofada da pata semanais representam a média dos escores de $\pm$ desvio padrão. O desafio com *L. major* em camundongos imunizados com DNA é representativo de duas diferentes experiências com virtualmente os mesmos resultados. * Na quarta semana, as diferenças entre o intumescimento da almofada da pata de camundongos de controle e vacinados foram significantes ($P < 0,001$).

(B) Carga de parasitas em linfonodos e baço oito semanas após a infecção em controles (pcDNA3) e dez semanas em vacinados (pcDNA3-histonas). As suspensões de células foram feitas do linfonodo popliteal de perna infectada e o baço. O número de parasitas viáveis foi determinado por limitação da diluição. Os resultados são expressos como desvio padrão $\pm$ médio (SD) do número total de parasitas por tecido (expresso como logaritmo decimal). Diferenças entre camundongos de controle e vacinados foram significantes em tanto os linfonodos popliteais como de baço ($P < 0,001$).

EXEMPLOS

Exemplo 1

Produção de uma vacina de DNA compreendendo histonas de *L. infantum*

Para determinar se as vacinas de DNA codificando histonas de *Leishmania* foram capazes de proteger camundongo contra infecção de *L. major*, os genes H2A, H2B, H3 e H4 de *L. infantum* foram subclonados no vetor de expressão eucariótico pcDNA3 para expressão sob o controle de um promotor de citomegalovírus forte (CMV). Então, a expressão de histonas de

Leishmania foi avaliada em células COS7 transfectadas com as construções de pcDNA3. A expressão de proteínas recombinantes por células de mamíferos transfectadas com DNA plasmídeo é uma condição crítica para o estímulo do sistema imune. As células COS7 transfectadas foram cultivadas durante 3 dias e a expressão de histonas de *Leishmania* foi avaliada por análises Western blot.

1.1. Clonagem de cDNA em vetor de expressão pcDNA3 de mamíferos

Para a expressão de quatro histonas de núcleo de *Leishmania infantum* no vetor de expressão de mamíferos pcDNA3, quatro clones de cDNA de comprimento completo foram empregados: H2A (clone cL72. Soto et al, Eur. J. Biochem. 1992, 205 (1): 211-6), H2B (clone LiH2B; Soto et al, Clin Exp. Immunol. 1999, 115 (2): 342-9), H3 (clone LiB6, Soto et al, Biochim. Biophys. Acta, 1994, 18: 1219 (2): 533-5), e H4 (clone LiH4-1), Soto et al Clin. Exp. Immunol. 1999, 115 (2) 342-9). Todos estes clones de cDNA foram previamente isolados de uma biblioteca de expressão de cDNA gt11 de *L. infantum*. Os insertos de EcoRI de clones de cDNA foram subclonados no sítio de corte correspondente do vetor de expressão de mamífero pcDNA3. O DNA destes plasmídeos recombinantes pcDNA3 foram purificados pelo kit de Giga preparação isento de endotoxinas (Qiagen, Hilden, Alemanha).

1.2. Expressão de histonas de *Leishmania* em células de mamíferos

Para confirmar que a construção de DNA foi funcional e expressou as proteínas acima mencionadas, as células COS7 foram transfectadas com 20 µg de cada construção pcDNA3 preparada na seção 1.1 usando o reagente Lipofectin® (Gibco, BRL) de acordo com as instruções dos fabricantes. Brevemente, 3×10^6 células foram semeadas em placas de 100 mm em meio de Eagle modificado por Dulbecco mais 5% fCS e

transfectados quando alcançaram 50 a 75% de confluência. 72 h após a transfecção, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS resfriado e imediatamente lisadas por adição de tampão de Laemmli. As proteínas derivadas de números equivalentes de células foram resolvidas por eletroforese de gel poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham, Aylesbury, UK). Os blots foram sondados com os soros de cachorros sofrendo de leishmaniose visceral (VCL) e purificados por cromatografia de afinidade contra proteínas H2B, H3, H4 em fase imobilizada) ou coelhos imunizados com rH2A.

Os resultados mostraram que as células transfectadas expressaram níveis detectáveis de proteínas H2A, H2B, H3 e H4.

1.3. Clonagem em vetor de expressão pQE30

Para expressão das histonas de *L. infantum* como proteínas recombinantes, as regiões de codificação foram amplificadas por PCR tomando como gabarito as construções de pcDNA3 de 1.1 e os seguintes nucleotídeos como iniciadores:

Para o gene H2A (sentido 5'-CGGGATCCATGGTACTCCTCGCAGC-3' (posições 1-17 da região de codificação); anti-sentido 5' - CCCAAGCTTACGCGCTCGGTGTCGCCC-3' (reverso e complementar a posições da região de codificação);

Para o gene H2B (sentido 5' - CGGGATCCGCCTCTTCTC GCTCTGC-3' (posições 1-17 da região de codificação), anti-sentido 5' - CCCAAGCTTCAAGCCGACGCGCTCGACAC-3' (reverso e complementar a posições da região de codificação);

Para o gene H3 (sentido 5' - CGGGATCCATGTCCCGCAC CAAGGAGA-3' (posições 1-19 da região de codificação); anti-sentido 5' - CCCAAGCTTCTAGTGGCGCTCACCGCGCA-3' (reverso e complementar a posições da região de codificação); e

Para o gene H4, (sentido 5'- CGGGATCCATGGCCAAGG

GCAAGCGTT-3' (posições 1-19 da região de codificação), anti-sentido 5'-
CCCAAGCTTACGCGTAGCCGTACAGGA-3' (reverso e complementar a
posições da região de codificação).

Os nucleotídeos sublinhados representam os sítios de corte
5 BamHI e HindIII incluídos para permitir a clonagem dos produtos PCR no
vetor de expressão pQB30 (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os clones resultantes
foram chamados pQE-H2A, pQE-H2B, pQE-H3 e pQE-H4.

1.4. Expressão e purificação das proteínas recombinantes
etiquetadas com His

10 A expressão de purificação das proteínas recombinantes
etiquetadas com His foi realizada em *Escherichia coli* M15 seguido por
procedimentos padrões (Qiagen). Após indução da proteína, as bactérias
foram coletadas, e lisadas por sonicação sob condições desnaturantes (8 M
uréia, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl), a purificação de proteína foi realizada
15 em uma coluna agarose NI_NTA (Qiagen). As proteínas recombinantes foram
gradualmente duplicadas na coluna de afinidade como descrito (Shi, 1997).
Depois, a proteína recombinante foi eluída com 0,3 M imidazol. Após
eluição, as frações contendo as histonas recombinantes foram reunidas e
dialisadas contra PBS. A proteína purificada foi ainda passada através de uma
20 coluna polimixina-agarose (Sigma, St. Louis, MO), a fim de eliminar
endotoxinas. A endotoxina residual foi medida com teste Amebócitos *Limulus*
cromogênico quantitativo (QCL- 1000, BioWhittaker, Walkersville, MD).

Exemplo 2 – Propriedades imunogenéticas de vacina de DNA

25 2.1. Preparação de antígeno de *Leishmania* total (SLA)

O antígeno de *Leishmania* solúvel (SLA) foi preparado por
três ciclos de congelamento / descongelamento de promastigotos estacionários
de *L. major* recolocados em suspensão em PBS. Após a lise das células, os
antígenos solúveis foram separados da fração insolúvel por centrifugação.

2.2. Imunizações e desafio do parasita

As experiências de imunização foram realizadas em grupos de dez camundongos. Os camundongos foram inoculados três vezes intramuscularmente (i.m.) em intervalos de 2 semanas em ambos os

5 quadríceps da pata traseira com 50 µg (2,5 µg por perna) de cada DNA plasmídeo (pcDNA3-H2A, pcDNA3-H2B, pcDNA3-H3 e pcDNA3-H4) como preparado na seção 1.1. em um volume total de 100 µl de PBS. Os camundongos de controle foram inoculados após o mesmo esquema mas com

10 200 µg de pcDNA3 em cada inoculação ou PBS sozinho. 14 dias após cada inoculação, os camundongos foram sangrados por punção do plexus orbital. Quatro semanas após a inoculação final, os baços e linfonodos (LN) de camundongos imunizados foram coletados e grupos de cinco camundongos imunizados foram desafiados com promastigotos de fase estacionária 5×10^4 cultivados injetados na almofada da pata traseira esquerda. O intumescimento

15 foi medido e é dado como a diferença entre a espessura da pata infectada versus almofada de controle contralateral.

2.3. Determinação de títulos de anticorpo e isotipos.

As amostras de soro foram analisadas para anticorpos de histonas anti-*Leishmania* específicos. Brevemente, as placas de ELISA

20 padrões foram revestidas durante a noite em temperatura ambiente com 100 µl de rH2A, rH2B, rH3 e rH4 (1 µg/ml em PBS) ou SLA (2 µg/ml em PBS). Uma diluição em série de soros foi realizada para determinar o título, que é definido como o inverso do maior fator de diluição no soro dando uma absorbância > 0,2. As análises específicas para isotipo foram feitas com as

25 seguintes imunoglobulinas anti-camundongo conjugadas a peroxidase de raiz forte (Nordic Immunological Lab. Tilburg, Holanda): anti-IgG1 (1:1000) e anti-IgG2a (1:500). O di-hidrocloreto de diamina ortofenila – OPD- (Dako A/S), Glostrup, Dinamarca) foi usado como substrato de peroxidase. Após 15 min, a reação foi parada com a adição de 100 µl de H₂SO₄ 1M, e a

absorbância foi lida a 450 nm.

2.4. Medida de citocinas em sobrenadantes

A liberação de IFN- γ e IL-4 foi medida nos sobrenadantes de
esplenócitos e culturas de LNCs. Os baços e linfonodos de camundongos
BALB/c foram removidos de modo asséptico após deslocamento cervical. As
suspensões de células de baço e linfonodos foram semeadas em meio RPMI
completo (RPMI 1640 suplementado com 10% FCS, 2 mM glutamina, e 10
mM 2-mercaptoetanol). As células 3×10^6 foram semeadas em placas de 48
reservatórios durante 72 h a 37 °C na presença de rH2A, rH2B, rH3 e rH4 (12
 $\mu\text{g/ml}$), histonas de timo de bezerro (SIGMA) ou Con a (2 $\mu\text{g/ml}$). A
produção de citocinas foi determinada por kits ELISA comerciais (Diacclone,
Besançon, França).

2.5. Quantificação de parasitas

O número de parasitas foi determinado em linfonodo popliteal
de perna e baço infectados por diluição limitativa (Buffet et al, 1995). Os
tecidos foram homogeneizados e diluídos em série em uma placa de
microtitulação de fundo plano de 96 cavidades contendo meio Schneider mais
20% FCS. O número de parasitas viáveis por linfonodo foi determinado da
diluição maior em que os promastigotos podem ser cultivados até 7 dias de
incubação a 26 °C.

2.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por um teste *t* de Student. As
diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

2.7. Resposta de anticorpo após vacinação com a vacina de DNA

Para estudar as propriedades imunogênicas de cDNAs, os
camundongos BALB/c foram imunizados intramuscularmente duas ou três
vezes a cada duas semanas com uma mistura de quatro plasmídeos preparados
em seção 1.1. codificando as histonas de *Leishmania infantum* (50 μg de

cDNA cada). Os anticorpos específicos para estes antígenos foram avaliados 2 semanas após a última imunização. Não foram detectados anticorpos específicos por ELISA após duas inoculações, enquanto os anticorpos IgG foram detectáveis em títulos baixos após a terceira inoculação. IgG2a foi o isotipo predominante de anticorpos em todos os casos. Somente uma leve produção de anticorpos de IgG1 foi também detectada contra as histonas H2A e H4.

2.8. Resposta de célula T após vacinação com a vacina de DNA

Para medir a resposta a célula T após a vacinação, as células mononucleares esplênicas e células de linfonodos (LNCs) foram obtidas 4 semanas após a última imunização de DNA e foram estimuladas in vitro com as proteínas recombinantes preparadas em seção 1.4. Após 3 dias de incubação, os sobrenadantes foram coletados e testados para tanto IFN α como IL-4.

Observou-se que em camundongos imunizados, as proteínas de histonas recombinantes estimularam a produção de IFN- γ em uma quantidade que é maior do que a encontrada em controles em tanto esplenócitos como células LNCs. Não pode ser detectada produção específica para histona IL-4 nos sobrenadantes de qualquer uma das culturas.

2.9. Análise da dependência a IL-12

A fim de caracterizar em maiores detalhes a resposta imune elicitada em camundongos por vacinação de DNA com os genes de histonas de *L. infantum*, e sua evolução após desafio com *L. mayor*, a produção específica para antígenos de IFN- γ por esplenócitos de camundongos vacinados foi avaliada. 22 dias após a infecção por *L. mayor*, esplenócitos de camundongos vacinados continuaram a produzir IFN- γ específico para histonas do que esplenócitos de camundongos de controle. Como interessante, a produção de IFN- γ mediada por SLA foi 2 vezes maior em esplenócitos de

camundongos vacinados como comparados com os de controles. Como a produção dependente de IL-12 de IFN- γ é o mecanismo principal associado com o controle de infecção por *L. major*, foi avaliado se a adição de anticorpo monoclonal anti-IL-12 a culturas substancialmente inibiu a produção de IFN- γ em esplenócitos de camundongos vacinados. A inibição de produção de IFN- γ foi verificada como sendo maior do que 80% para os quatro diferentes estímulos usados (histonas de *L. infantum* H2A, H2B, H3 e H4). Isto indica que a produção de IFN- γ específico para histonas é dependente de IL-12 e, além disso, que a produção in vitro de IL-12 é também estimulada em esplenócitos pelas histonas leishmaniosas.

2.10. O envolvimento de células CD4+ e CD8+ na produção de IFN- γ .

As contribuições relativas de células CD4+ e CD8+ para a produção de IFN- γ foi determinada. O estímulo mediado por histonas de produção de IFN- γ de esplenócitos de todos os grupos foi substancialmente inibido pela adição às culturas de anticorpos monoclonais anti-CD4. No entanto, a adição de anticorpos monoclonais anti-CD8 às culturas induziu uma redução de secreção de IFN- γ apenas nos esplenócitos de camundongos vacinados e estimulados in vitro com ou histonas H2A ou H3. Assim, a vacinação com DNA com genes codificando histonas H2A e H3 de *Leishmania* parece estar influenciando mais as células CD8 do que os dois outros genes de histonas (H2B e H4).

Finalmente, a fim de prover outras abordagens no estado imune associado com a proteção elicitada em camundongos por vacinação com DNA com os genes codificando para as histonas de *L. infantum*, a frequência de células CD4+ e CD8+ produzindo IFN- γ nos LNCs foi avaliada por coloração de citocinas intracelulares no final dos estudos de proteção (8 camundongos de controle e 10 camundongos vacinados). A frequência de ambas as células CD4+ e CD8+ produzindo IFN- γ foi maior em

camundongos vacinados do que em controles. Assim, estes dados são um suporte direto de que a proteção contra infecção por *L. major*, obtida por vacinação com DNA com histonas de *Leishmania*, está correlacionada nos camundongos vacinados com uma frequência melhorada de células T (CD4+ e CD8+) produzindo IFN- γ .

Estes resultados estão de acordo com a predominância de anticorpos IgG2a nos soros de camundongos imunizados e indica que a imunização de DNA com os genes de histonas H2A, H2B, H3 ou H4 elicitou preferivelmente uma resposta imune semelhante a Th1 contra estes antígenos. Outras experiências de teste (ver exemplo 3) tinham de mostrar se os genes tinham também um efeito protetor.

Exemplo 3 – Proteção contra *Leishmania major* induzida pelas vacinas de DNA codificando para histonas de *Leishmania infantum*

Porque as experiências de imunogenicidade revelaram que a imunização de DNA com histonas acionou a indução de respostas imunes semelhantes a Th1 específicas, os requerentes a seguir se perguntaram se o regime imunogênico de cDNA usando os genes H2A, H2B, H3 ou H4 poderiam prover proteção contra infecção de camundongo com *L. major*.

3.1. Vacina de DNA codificando histonas de *L. infantum* protegem contra infecção por *L. major*

Grupos de sete camundongos BALB/c foram inoculados intramuscularmente duas ou três vezes como acima mencionado, duas semanas de intervalo, com 50 μ g de cada construção histona –DNA como na seção 1.1. Os controles foram inoculados do mesmo modo com 200 μ g de vetor vazio usado para a clonagem de cDNA dos genes de histonas ou com PBS sozinho. Quatro semanas após a última imunização com DNA, os camundongos foram desafiados na almofada da pata esquerda com formas de promastigotos estacionários 5×10^4 cultivados de *L. major*, como preparado na seção 2.1. O intumescimento da almofada da pata foi medido

semanalmente.

Os resultados da figura 1A indicam que a vacinação de DNA com genes de histonas induziram proteção contra infecção, enquanto o vetor sozinho não. Os requerentes observaram um retardo claro no intumescimento da almofada da pata em camundongos vacinados. Em todos os casos, os camundongos imunizados mostram uma inflamação mais controlada (cerca de 1 mm em oito semanas após infecção) do que os controles (cerca de 5 mm na mesma semana). Não foram de todo observadas lesões em quatro de sete camundongos durante o curso da infecção. Esta experiência foi reproduzida com resultados similares.

3.2. Carga de parasitas de baço e linfonodo após vacinação com vacina de DNA codificando histonas.

Para determinar se o intumescimento da almofada da pata reduzida estava correlacionado com a carga parasita em baço e linfonodos popliteais, os camundongos foram submetidos a eutanásia 10 semanas após a infecção do grupo de camundongos vacinados e 8 semanas após infecção dos controles). Os camundongos vacinados demonstraram uma carga de parasitas significante menor do que determinado nos controles (figura 1B). De modo notável, a visceralização do parasita foi observada homogeneamente em controles (pcDNA3) enquanto em camundongos vacinados, a carga parasita foi baixa, e em alguns casos não foram detectados parasitas. Todos estes dados sugerem que os camundongos vacinados estão controlando a leishmaniose cutânea induzida por *L. major*.

Exemplo 4 – Imunização com histonas em uma forma individual

Os exemplos anteriores mostraram que a injeção com um coquetel de DNA de plasmídeos pcDNA3 de expressão eucariótica contendo os genes para as histonas (H2A, H2B, H3 ou H4) de *Leishmania infantum* em camundongos BALB/c, leva a uma resposta imune Th1 específica que resulta

no controle de infecção por *L. major*. No presente exemplo, os requerentes estudaram o efeito da imunização genética com cada um destes pcDNA3 codificando H2A, H2B, H3 e H4 nucleossomai, administrados separadamente. As condições de experiências foram como descrito acima.

5 Os resultados indicam que em todos os casos a administração de cada histona pcDNA3 induz uma diminuição de ambas as citocinas Th2 IL-4 e IL-10 9 semanas após a infecção por *L. major* concomitantemente com uma resposta humoral menor contra antígeno SLA leishmanial solúvel e uma resposta humoral limitada contra histonas (dominada por anticorpos IgG2a),
10 comparado com os camundongos de controle imunizados com um pcDNA3 vazio. Além disso, resultados da análise de proliferação de esplenócitos nos camundongos de controle mostram a existência de uma resposta imune celular deprimida aos mitógenos Con A, LPS e para SLA. Durante o curso da infecção, os camundongos vacinados demonstraram um retardo no
15 intumescimento da almofada da pata e uma menor carga parasítica nos linfonodos popliteais comparado com os camundongos de controle. Em conclusão, a administração de cada histona pcDNA3 codificando as histonas nucleossomais de *Leishmania* diminui a resposta acionada por Th2 induzida por infecção por *L. major*, levando a uma baixa produção de IL-4 e IL-10 no
20 baço, e uma baixa resposta humoral que está correlacionada com a proteção contra leishmaniose cutânea de murinos. Os resultados também indicam que, dentre as histonas de *Leishmania*, a imunização de DNA com H4 é a mais eficaz na indução de imunidade protetora contra leishmaniose cutânea.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de todas as quatro histonas de Leishmania H2A, H2B, H3 e H4 **caracterizado** pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento, diagnóstico ou prevenção de uma doença parasítica, em que a doença parasitária é causada por
5 uma espécie diferente das espécies das quais as histonas foram derivadas.
2. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que cada histona está presente em quantidades equimolares.
3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o medicamento é uma vacina.
- 10 4. Uso de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a vacina é uma vacina à base de proteína.
5. Uso de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a vacina é uma vacina de DNA que compreende os genes que codificam todas as histonas H2A, H2B, H3 e H4.
- 15 6. Uso de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que um ou mais genes das histonas H2A, H2B, H3 ou H4 são inseridos em um ou mais vetores.
7. Uso de acordo com a reivindicação 5 ou 6, **caracterizado** pelo fato de que a vacina compreende um gene quimérico que codifica duas ou mais histonas.
8. Uso de um vetor compreendendo os nucleotídeos codificando as histonas H2A,
20 H2B, H3 ou H4, **caracterizado** pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento, diagnóstico ou prevenção de uma doença parasítica, em que a doença parasitária é causada por uma espécie diferente das espécies das quais as histonas foram derivadas.
9. Uso de anticorpos dirigidos contra cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4 **caracterizado** pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento,
25 diagnóstico ou prevenção de uma doença parasítica, em que a doença parasitária é causada por

uma espécie diferente das espécies das quais as histonas foram derivadas.

10. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que as histonas são obtidas a partir de *Leishmania infantum*.

11. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo
5 fato de que a doença parasítica é uma doença de Leishmaniose.

12. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que a doença parasítica é causada pela espécie *L.major* ou *L.infantum*.

13. Composição farmacêutica **caracterizado** pelo fato de que compreende todas as histonas H2A, H2B, H3 e H4 ou genes codificando estas histonas além de um adjuvante e/ou
10 veículo farmacêuticamente aceitável.

14. Agente ou Kit diagnóstico **caracterizado** pelo fato de que compreende todas as histonas H2A, H2B, H3 e H4.

15. Agente ou Kit diagnóstico de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que compreende anticorpos contra cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4.

Fig 1a

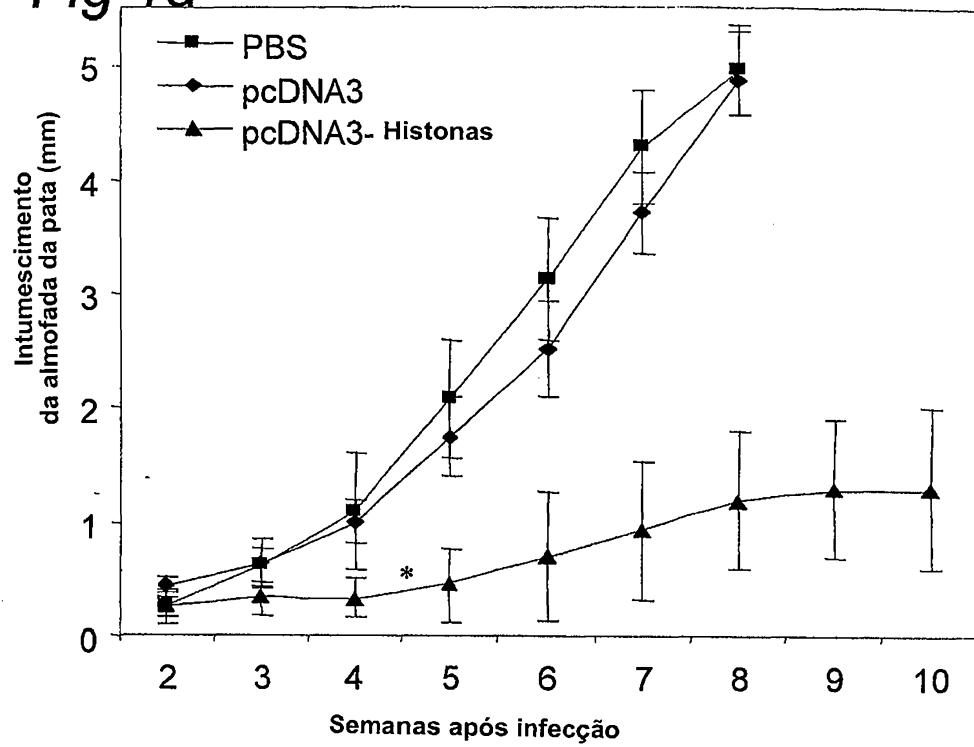


Fig 1b

