



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

**(11) PI 9916549-0 B1**

**(22) Data do Depósito:** 23/12/1999

**(45) Data de Concessão:** 02/10/2018



**(54) Título:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROTEÍNA, POLINUCLEOTÍDEO

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/30; C12N 15/62; C07K 14/44; C07K 16/20; A61K 31/70; A61K 38/16; A61K 39/395; A61P 33/02

**(30) Prioridade Unionista:** 23/12/1998 CA 2,256,124, 23/12/1998 US 60/113,825

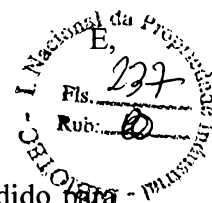
**(73) Titular(es):** C.B.F. LETI, S.A.

**(72) Inventor(es):** CARLOS BEDATE ALONSO

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 22/06/2001

“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROTEÍNA, POLINUCLEOTÍDEO”.

### OBJETO DA INVENÇÃO



O presente relatório descritivo diz respeito a um pedido para

- 5 uma Patente de Invenção, com respeito a um gene quimérico formado das seqüências de DNA que codificam os determinantes antigênicos de quatro proteínas de *L. infantum*, e a proteínas codificadas por dito gene quimérico, útil para a prevenção ou tratamento da leishmaniose, em particular da leishmaniose canina. A finalidade óbvia disto situa-se no uso da seqüência do
- 10 gene ou da proteína obtida do gene quimérico para prover composições farmacêuticas para prevenir ou tratar da leishmaniose, em particular a leishmaniose canina, que pode estar presente no corpo de um paciente, por exemplo como uma vacina ou uma preparação de anticorpos monoclonais. Este paciente não tem de ser um cão, mas também pode ser um ser humano
- 15 que sofra de doenças que envolvam a imunodepressão. Para se obter isto, será produzido um gene quimérico que codifique uma proteína denominada PQ, consistindo de um produto quimérico originário de uma síntese “*in vitro*” de um gene quimérico construído “*ad hoc*”, que contenha cinco dos determinantes antigênicos de quatro diferentes proteínas. O produto é
- 20 configurado como altamente sensível e específico para, por exemplo, gerar uma resposta imune protetora contra a leishmaniose canina, ou para preparar anticorpos contra a leishmaniose canina.

### CAMPO DA INVENÇÃO

- 25 Esta invenção é de utilidade dentro da indústria dedicada à fabricação de produtos farmacêuticos em geral.

### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os protozoários parasíticos do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos que causam a leishmaniose, uma faixa de doenças que

têm uma distribuição mundial e que são caracterizadas no fato de que elas dão origem a uma ampla variedade de sintomas clínicos.

As principais formas de leishmaniose são zoonóticas por natureza e os seres humanos são considerados como hospedeiros secundários. A espécie denotada como *L. infantum*, amplamente distribuída na totalidade de muitas áreas do Mar Mediterrâneo, é a causa da leishmaniose visceral (LV) nos seres humanos e em cães.

De fato, os cães infectados com *L. infantum* são a principal reserva animal deste parasita, particularmente durante longo período de incubação antes que os sintomas clínicos possam ser observados.

Os dados epidemiológicos indicam que existe uma correlação direta entre a prevalência da leishmaniose canina e a transmissão do parasita aos seres humanos. Por esta razão, é crucial detectar a doença ou a infecção prematuramente em campanhas empreendidas para controlar a expansão da doença.

O parasita é transmitido ao vertebrado hospedeiro como um promastigoto flagelar, por meio de uma picada de um mosquito da família “*Phlebotominae*”, e o parasita entra nas células dos fagos mononucleares em que eles se diferenciam e reproduzem como amastigotos dentro da estrutura fagolisossômica.

As células infectadas se agrupam em certos tecidos, principalmente no baço, no fígado e nos linfonodos. Estima-se que cerca de 15 milhões de pessoas sejam infectadas com a leishmaniose, e a cada ano, no mundo, 500.000 novos casos clínicos apareçam no mundo, principalmente no mundo subdesenvolvido e em desenvolvimento.

Nos países do sudoeste da Europa, a leishmaniose visceral (VL) é uma doença zoonótica causada pela espécie *L. Infantum*, como foi anteriormente mencionado. Dados recentes derivados de estudos epidemiológicos indicam que existe uma incidência alarmante desta infecção.

Na Itália, os dados relatados quanto à incidência de VL variam de 14,4% a 37%, de acordo com a região.

Em Portugal, mais particularmente na área ao redor de Lisboa, os índices de soropositivos de 8,4% têm sido observados, e na região dos Alpes Marítimos Franceses têm sido observados diferentes centros de predominância que variam entre 3,2% e 17,1%.

Na Espanha, a predominância da leishmaniose depende da zona em estudo. Na Catalunha, um índice médio de incidência de 9,3% tem sido observado, não obstante em alguns pontos quentes uma predominância de cães infectados de até 18% tenha sido observada.

Na Ilha de Malorca, o índice de incidência é de 14%, e outros índices que têm sido observados são: 2,4% em Murcia, 8,8% em Granada, de 10 a 15% em Salamanca, 5,25% na província de Madri, e de 14% em Cáceres.

Embora o número de casos de VL em seres humanos, causados por *L. infantum* possam ser considerados relativamente baixos, o elevado percentual de pacientes com imunodepressão que se tornaram infectados por leishmânia pode estar relacionado ao alto nível desta doença em cães.

De fato, no Sul da Europa, 50% dos adultos que são infectados por leishmaniose são também pacientes infectados com o vírus de HIV. Por outro lado, de acordo com estes dados de infecção simultânea de leishmânia-HIV, tem-se estimado que o nível de infecção (por parasitas) pode ser de uma ou duas ordens de grandeza mais elevado do que este número, devido à existência de um grande número de infecções não detectadas.

Uma característica comum dos diferentes tipos de infecção de Leishmânia é que ela induz a uma forte resposta humoral no hospedeiro. Portanto, os processos de diagnóstico com base em técnicas sorológicas são presentemente os mais amplamente usados.

Foi descrito que estes anticorpos são detectados mesmo durante a fase assintomática da doença em infecções naturais e experimentais.

5 A sensibilidade e especificidade destes processos dependem do tipo, da fonte e da pureza do antígeno usado. Em processos imunológicos que são correntemente comercializados, promastigotos completos e preparações mais ou menos preparadas destes, são usadas como uma fonte de antígeno. Este processo normalmente conduz a reações cruzadas com o soro de pacientes que estejam padecendo de lepra, tuberculose, tripanosomíase, doença de Chagas, malária e outras parasitoses.

10 A sensibilidade e especificidade dos processos sorológicos dependem do tipo, da fonte e da pureza do antígeno empregado. Durante os últimos anos, um grande número de antígenos da Leishmânia tem sido caracterizado, alguns deles podendo ser considerados como proteínas específicas para o parasita.

15 Entre estas proteínas específicas para o parasita, a protease de superfície GP63, a glicoproteína gp46 de superfície e a proteína KMP-11 associada com lipofosfoglicano, merecem uma menção.

20 Um grupo adicional de antígenos da Leishmânia é formado de proteínas evolucionariamente conservadas, tais como a cinesina, as proteínas termicamente induzidas, a actina e a tubulina.

Como parte de uma estratégia para desenvolver um sistema diagnóstico sorológico específico para a leishmaniose canina, um projeto com base em laboratório foi empreendido para identificar os antígenos de *L. infantum*, por meio de uma pesquisa de imunodeteção de uma biblioteca de expressão para genes de *L. infantum*, usando-se soro de cães com leishmaniose visceral ativa.

Foi observado que a maioria dos antígenos isolados por este processo pertence à família de proteínas conservadas no decurso de evolução.

A identificação dos epítomos B destes antígenos indica, no entanto, que, em todos os casos, os determinantes antigênicos foram localizados em regiões que não eram bem conservadas.

Em particular, as proteínas ribossômicas ácidas LiP2a e LiP2b são reconhecidas por mais do que 80% dos soros de VL.

Tem sido confirmado que estas proteínas contêm determinantes antigênicos específicos da doença, e que as proteínas recombinantes LiP2a e LiP2b, das quais um fragmento tenha sido removido, podem ser usadas como um instrumento específico capaz de distinguir entre a VL e a doença de Chagas.

Tem sido observado também que a proteína ribossômica PO de *L. infantum*, muito altamente conservada na escala evolucionária, é reconhecida por um alto percentual de soros de VL de cães. Além disso, os determinantes antigênicos são observados exclusivamente no término C da proteína, o que equivale a dizer, na região em que foi fracamente conservada no decurso da evolução.

Foi observado que, em 78% dos soros de VL de cães, os anticorpos contra a proteína H2A estão também presentes, e foi confirmado que, apesar da identidade da sequência em todas as proteínas H2A entre os organismos eucarióticos, a resposta humoral a esta proteína nos soros de VL é particularmente provocada por determinantes específicos à proteína H2A da Leishmânia.

Os determinantes antigênicos reconhecidos pelos soros de VL de cães são encontrados em ambos os termos da proteína H2A.

A solução óbvia para o problema correntemente encontrado nesta técnica deveria ser possuir-se uma invenção que permitisse a montagem de um gene quimérico sintético que contivesse as regiões de DNA codificando os determinantes antigênicos específicos para as proteínas LiP2a, LiP2b, LiPO e H2A, com vistas a construir uma proteína rica em

determinantes antigênicos.

No entanto, tanto quanto seja do conhecimento do requerente, não existe presentemente nenhuma invenção que contenha as características descritas como ideais, com vistas a alcançar-se o objetivo desejado. Este objetivo é a construção de uma proteína rica em determinantes antigênicos, que se origine da montagem de um gene sintético quimérico que contenha as regiões de DNA codificando os determinantes antigênicos específicos às proteínas acima mencionadas.

#### DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Em um primeiro aspecto, a invenção diz respeito a um gene quimérico formado pelas seqüências de DNA que codificam determinantes antigênicos de quatro proteínas de *L. infantum*, úteis para prevenir ou tratar a leishmaniose canina.

Em um outro aspecto, a invenção diz respeito a uma proteína codificada pelo dito gene quimérico, contendo um ou mais dos determinantes antigênicos de quatro proteínas de *L. infantum* codificadas pelo gene quimérico.

A invenção ainda diz respeito a um processo para prevenir e/ou tratar leishmaniose canina em um ser humano ou um animal. Neste processo terapêutico, o gene quimérico da invenção ou a proteína codificada por ele podem ser usados. Igualmente, os anticorpos contra a proteína codificada pelo gene quimérico da invenção, ou uma sua parte antigênica, tal como um epítopo, podem ser usadas.

Em outros aspectos, a invenção diz respeito a composições farmacêuticas para a prevenção e/ou tratamento, em seres humanos e/ou animais, de leishmaniose, compreendendo uma substância ativa derivada, ou direcionada contra, o gene quimérico da invenção e/ou a proteína codificada por ele, ou partes dele. A substância ativa é preferivelmente tal que ela pode ser usada em uma composição farmacêutica para o tratamento e/ou prevenção

da leishmaniose.

Em particular, a composição farmacêutica será em uma forma de uma vacina, contendo a proteína codificada pelo gene quimérico da invenção, ou uma ou mais de suas partes, contendo um ou mais dos determinantes antigênicos da proteína codificados pelo gene quimérico da invenção.

Assim sendo, em um outro aspecto, a invenção diz respeito a uma composição farmacêutica para a prevenção e tratamento, de seres humanos ou de animais, de leishmaniose, formada:

a) pela proteína Quimera Q, ou uma variante desta proteína contendo modificações ou substituições de aminoácidos preservados administrados a um paciente (humano ou animal), ou

b) pela proteína Q na forma isolada ou combinada com qualquer adjuvante fisiológico pela via intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular.

A invenção também diz respeito a uma vacina que seja capaz de estimular a produção de anticorpos que reconheçam o parasita da leishmânia, formada:

a) pela proteína Quimera Q ou uma variante desta proteína, que difira da proteína Q nos aminoácidos preservados, administrada a um paciente (humano ou animal), ou

b) pela proteína Q na forma isolada ou combinada com um adjuvante fisiológico pela via intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular.

Além disso, a invenção diz respeito a uma composição farmacêutica para a prevenção e tratamento, de ser humano ou animal, de leishmaniose, formada:

a) pela proteína Q, ou uma variante desta proteína contendo modificações ou substituições de aminoácidos preservados, combinada com a proteína LiHsp70, completa ou fragmentada, administrada a um paciente

(humano ou animal), ou

b) pela proteína Q na forma isolada ou combinada com um adjuvante fisiológico pela via intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular.

Em ainda outro aspecto, a invenção diz respeito a uma composição farmacêutica para a prevenção e tratamento, de ser humano ou animal, de leishmaniose, formada:

a) por qualquer vetor de DNA conduzindo a sequência que codifica para a proteína Quimera Q, ou uma variante daquela sequência que contenha modificações ou substituições de nucleotídeos que codificam para aminoácidos preservados, administrado a um paciente (humano ou animal), ou

b) por um vetor de DNA que contenha a proteína Q combinada com um adjuvante fisiológico, administrado pela via intraperitoneal, intramuscular ou subcutânea.

Outro aspecto da invenção diz respeito a uma composição farmacêutica para a prevenção e tratamento, de ser humano ou de animal, da leishmaniose, formada:

a) por qualquer vetor de DNA carregando:

1) a sequência que codifica para a proteína Quimera Q, ou uma variante daquela sequência que contenha modificações ou substituições de nucleotídeos que codificam para os aminoácidos preservados, e

2) a sequência de nucleotídeos que codifica para a proteína LiHsp70 ou variantes desta que difiram com respeito aos aminoácidos preservados, administrada a um paciente (ser humano ou animal), ou

b) por qualquer vetor que contenha a sequência de DNA que codifica para a proteína Q como definido sob a), administrado com um adjuvante fisiológico pela via intraperitoneal, intramuscular ou subcutânea.

Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica da invenção compreende anticorpos direcionados à proteína codificada pelo

gene quimérico da invenção, ou partes deste.

As preparações farmacêuticas da invenção podem ainda conter todos os adjuvantes, solventes, tampões etc., por si conhecidos para composições farmacêuticas e/ou vacinas.

5 Em um outro aspecto, a invenção diz respeito a um processo para o tratamento ou prevenção da leishmaniose, usando-se uma composição farmacêutica ou uma vacina de acordo com a invenção, ou uma preparação que compreenda anticorpos dirigidos contra a proteína codificada pelo gene quimérico da invenção.

10 Este processo geralmente compreenderá administrar uma substância ativa dirigida contra o gene quimérico ou a proteína a um ser humano ou animal, tal como um cão, em uma quantidade farmacêuticamente ativa.

15 Para a prevenção da leishmaniose, uma vacina compreendendo a proteína codificada pelo gene quimérico, ou codificando uma ou mais partes da dita proteína compreendendo um ou mais dos determinantes antigênicos, será administrada a um ser humano para eliciar uma resposta imune protetora.

20 A administração das preparações, anticorpos e/ou vacinas da invenção podem ser realizadas em uma maneira por si conhecida, tal como oralmente, intramuscularmente, intravenosamente, subcutaneamente, por infusão (gotejamento), etc. Preferivelmente, a preparação ou uma vacina é injetada, enquanto, quanto a uma preparação de anticorpos, uma infusão pode ser usada.

25 Deve ser observado que, quando é aqui feita referência ao gene quimérico da invenção, esta expressão também abrange as seqüências de ácido nucleico que podem hibridizar com a seqüência mencionada abaixo sob condições de hibridização moderadas ou severas.

Neste contexto, as condições de hibridização heteróloga

podem ser como segue: hibridização em 6 x SSC (20xSSC por 1000 ml : 175,3 g de NaCl, 107,1 g de citrato de sódio.5H<sub>2</sub>O, pH 7,0), SDS 0,1%, pirofosfato de sódio a 0,05%, 5\* solução de Denhardt [100 x solução de Denhardt por 500 ml : 10 g de Ficoll-400, 10 g de polivinil pirrolidona, 10 g de soro albumina bovino (Pentax Fraction V)] e 20 µg/ml de DNA de esperma de arenque desnaturado a 56°C por 18 a 24 horas, seguido por duas lavagens de 30 minutos em 5 x SSC, SDS a 0,1% a 56°C e duas lavagens de 30 minutos em 2 x SSC, SDS 0,1% a 56°C.

Por exemplo, as seqüências que podem hibridizar com a seqüência mencionada abaixo incluem as seqüências de DNA mutante que codificam as proteínas com a mesma função biológica da proteína codificada pela seqüência aqui abaixo mencionada. Tais seqüências mutantes podem compreender uma ou mais deleções, substituições e/ou adições de nucleotídeos às seqüências mencionadas abaixo. Preferivelmente, as seqüências mutantes ainda terão pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 70%, ainda mais preferivelmente mais do que 90% de homologia de nucleotídeos com a seqüência aqui fornecida abaixo.

A expressão gene quimérico como aqui empregada também abrange as seqüências de ácido nucleico que compreendem uma ou mais partes da seqüência aqui abaixo mencionada. De preferência, tais seqüências compreendem pelo menos 10%, mais preferivelmente pelo menos 30%, mais preferivelmente pelo menos 50% da seqüência de nucleotídeos dada abaixo. Tais seqüências podem compreender um fragmento contíguo da seqüência aqui abaixo mencionada, ou dois ou mais fragmentos da seqüência dada abaixo que tenham sido combinados e/ou incorporados em uma seqüência singular de DNA.

Deve ser observado que, quando é aqui feita referência a uma proteína codificada pelo gene quimérico da invenção, este termo também inclui proteínas mutantes que ainda tenham essencialmente a mesma função

biológica. Tais proteínas mutantes podem compreender uma ou mais deleções, substituições e/ou adições de aminoácidos, em comparação com a proteína codificada pela sequência mencionada abaixo. Preferivelmente, as proteínas mutantes ainda têm pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 70%, ainda mais preferivelmente mais do que 90% de homologia de aminoácido com a sequência aqui abaixo fornecida.

O termo proteína também abrange fragmentos da proteína codificada pelo gene quimérico da invenção. Tais fragmentos preferivelmente ainda apresentam a atividade biológica da proteína completa. Preferivelmente, tais proteínas compreendem pelo menos 30%, mais preferivelmente pelo menos 50% da sequência de aminoácidos da proteína completa. Igualmente, dois ou mais fragmentos da proteína completa codificados pelo gene quimérico da invenção podem ser combinados para formar uma proteína singular.

15 Mais especificamente, a invenção diz respeito a um gene quimérico formado pelas sequências de DNA que codificam determinantes antigênicos de quatro proteínas de *L. infantum*, codificando uma proteína útil para fins farmacológicos, em particular para a prevenção e/ou tratamento da leishmaniose, em particular a leishmaniose canina, e obtenção do produto  
20 final ou a construção do gene quimérico que codifica um polipeptídeo que contenha todos os determinantes antigênicos selecionados, caracterizado pelo fato de que usa uma estratégia de clonagem em que o clone que expressa a proteína rLiPO-Ct-Q seja usado como um vetor inicial, e a este vetor, por meio do uso de sítios de restrição adequados, fragmentos de DNA sejam  
25 subsequentemente adicionados, que codifiquem as proteínas LiP2a-Q, LiP2b-Q, LiH2A-Ct-Q, LiH2a-Nt-Q e, após cada etapa de clonagem, a orientação correta de cada um dos insertos seja deduzida e o tamanho dos produtos de expressão, a sequência de aminoácidos deduzida completa da proteína de fusão final, pPQV, expressa no vetor pMAL, seja:

MBP IEGRPLTPRSAKKAVRKSGSKSAKCGLIFPVGRVGGMMRRGYARRIGA 50  
 SGAPRISEFSVKAAAQSGKKRCRLNPRTVMLAARHDDDIGTLLKNVTLSHSGVV 140  
 PNISKAMAKKKGGKKGKATPSAPEFGDSSRPMSTKYLAAYALASLSKASPSQAD 157  
 VEAICKAVHIDVDQATLAFVMESVTGRDVATLIAEGAAKMSAMPAASSGAAAGV 211  
 TASAAGDAAPAAAAAKKDEPEEEADDDMGFSVRDPMQYLAAYALVALSGKTPSK 265  
 STAGAGAGAVAEAKKEEPEEEEEADDDMGPVDLQPAAAAAPAAPSAAAKAAPEESD 374  
 EDDFGMGGLF (SEQ ID NO.3)

A invenção também diz respeito a uma composição farmacêutica para a prevenção e tratamento, em seres humanos ou em animais, da leishmaniose, formada:

5 a - pela proteína Quimera Q, ou uma variante desta proteína, que contenha modificações ou substituições de aminoácidos conservados, administrada a um paciente (humano ou animal), ou

b - na forma isolada ou junto com qualquer adjuvante fisiológico através das vias intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular.

10 Igualmente, a invenção diz respeito a uma vacina capaz de estimular a produção de anticorpos que reconheçam o parasita da Leishmânia, formada:

a - pela proteína Quimera Q, ou uma variante desta proteína, que difira da proteína Q nos aminoácidos conservados, administrada a um paciente (humano ou animal), ou

15 b - na forma isolada ou junto com qualquer adjuvante fisiológico através das vias intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular.

Outro aspecto da invenção compreende uma composição farmacêutica para a prevenção e tratamento, em seres humanos ou animais, de leishmaniose, formada:

20 a - pela proteína Q, ou uma variante desta proteína, que contenha modificações ou substituições de aminoácidos conservados, ligados à proteína LiHsp70, completa ou fragmentada, administrada a um paciente (humano ou animal), ou

b - na forma isolada ou junto com qualquer adjuvante fisiológico através das vias intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular.

Uma outra composição farmacêutica da invenção para a prevenção e tratamento, em seres humanos ou animais, da leishmaniose, pode ser formada:

a - por qualquer vetor de DNA carregando a sequência que codifica a proteína Quimera Q, ou uma variante desta sequência, que contenha modificações ou substituições de nucleotídeos que codificam para os aminoácidos conservados, administrado a um paciente (humano ou animal), ou

b - pelas vias intramuscular ou subcutânea.

Em outro aspecto, a invenção diz respeito a uma composição farmacêutica para a prevenção e tratamento, em seres humanos ou animais, de leishmaniose, formada:

a - por qualquer vetor de DNA carregando 1) a sequência que codifica a proteína Quimera Q, ou uma variante desta sequência que contenha modificações ou substituições de nucleotídeos que codificam para aminoácidos conservados, e 2) a sequência que codifica a proteína LiHsp70, ou variantes dela, que difira nos aminoácidos conservados, administrada a um paciente (humano ou animal), ou

b - pela via intramuscular, subcutânea ou intramuscular.

A invenção igualmente diz respeito a uma sequência de nucleotídeos e a uma proteína útil para fins farmacológicos, em particular para a prevenção e/ou tratamento da leishmaniose, em particular a leishmaniose canina, tendo a sequência de DNA e de aminoácidos mostrada abaixo, expressa no vetor PQ31. A sequência de aminoácidos contém um fragmento do vetor (AA 1 a 37). O restante da sequência de aminoácidos é idêntica àquela da SEQ ID NO: 3, exceto na porção de MBP e nos primeiros sete aminoácidos (AA 1 a 7):

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | ATG | AGA | GGA | TCT | CAC | CAC | CAC | CAC | CAC | CAC | ACG | GAT | CCG | CAT | GCG | 45  |
|     | Met | Arg | Gly | Ser | His | His | His | His | His | His | Thr | Asp | Pro | His | Ala |     |
|     |     |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |
| 46  | AGC | TCG | AAC | AAC | AAC | AAC | AAT | AAC | AAT | AAC | AAC | AAC | CTC | GGG | ATC | 90  |
|     | Ser | Ser | Asn | Asn | Asn | Asn | Asn | Asn | Asn | Asn | Asn | Asn | Leu | Gly | Ile |     |
|     |     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |
| 91  | GAG | GGA | AGG | CCT | TTA | GCT | ACT | CCT | CGC | AGC | GCC | AAG | AAG | GCC | GTC | 135 |
|     | Glu | Gly | Arg | Pro | Leu | Ala | Thr | Pro | Arg | Ser | Ala | Lys | Lys | Ala | Val |     |
|     |     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |
| 136 | CGC | AAG | AGC | GGC | TCC | AAG | TCC | GCG | AAA | TGT | GGT | CTG | ATC | TTC | CCG | 180 |
|     | Arg | Lys | Ser | Gly | Ser | Lys | Ser | Ala | Lys | Cys | Gly | Leu | Ile | Phe | Pro |     |
|     |     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     | 60  |
| 181 | GTG | GGC | CGC | GTC | GGC | GGG | ATG | ATG | CGC | CGC | GGC | CAG | TAC | GCT | CGC | 225 |
|     | Val | Gly | Arg | Val | Gly | Gly | Met | Met | Arg | Arg | Gly | Gln | Tyr | Ala | Arg |     |
|     |     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |
| 226 | CGC | ATC | GGT | GCC | TCT | GGC | GCC | CCC | AGG | ATT | TCA | GAA | TTC | TCC | GTG | 270 |
|     | Arg | Ile | Gly | Ala | Ser | Gly | Ala | Pro | Arg | Ile | Ser | Glu | Phe | Ser | Val |     |
|     |     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |
| 271 | AAG | GCG | GCC | GCG | CAG | AGC | GGG | AAG | AAG | CGG | TGC | CGC | CTG | AAC | CCG | 315 |
|     | Lys | Ala | Ala | Ala | Gln | Ser | Gly | Lys | Lys | Arg | Cys | Arg | Leu | Asn | Pro |     |

|                                                             | 95  | 100 | 105 |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 316                                                         |     |     | 360 |
| CGC ACC GTG ATG CTG GCC GCG CGC CAC GAC GAC GAC ATC GGC ACG |     |     |     |
| Arg Thr Val Met Leu Ala Ala Arg His Asp Asp Asp Ile Gly Thr | 110 | 115 | 120 |
| 361                                                         |     |     | 405 |
| CTT CTG AAG AAC GTG ACC TTG TCT CAC AGC GGC GTT GTG CCG AAC |     |     |     |
| Leu Leu Lys Asn Val Thr Leu Ser His Ser Gly Val Val Pro Asn | 125 | 130 | 135 |
| 406                                                         |     |     | 450 |
| ATC AGC AAG GCG ATG GCA AAG AAG AAG GGC GGC AAG AAG GGC AAG |     |     |     |
| Ile Ser Lys Ala Met Ala Lys Lys Lys Gly Gly Lys Lys Gly Lys | 140 | 145 | 150 |
| 391                                                         |     |     | 495 |
| GCG ACA CCG AGC GCG CCC GAA TTC GGA TCC TCT AGA CCC ATG TCC |     |     |     |
| Ala Thr Pro Ser Ala Pro Glu Phe Gly Ser Ser Arg Pro Met Ser | 155 | 160 | 165 |
| 496                                                         |     |     | 540 |
| ACC AAG TAC CTC GCC GCG TAC GCT CTG GCC TCC CTG AGC AAG GCG |     |     |     |
| Thr Lys Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Ala Ser Leu Ser Lys Ala | 170 | 175 | 180 |
| 541                                                         |     |     | 585 |
| TCC CCG TCT CAG GCG GAC GTG GAG GCT ATC TGC AAG GCC GTC CAC |     |     |     |
| Ser Pro Ser Gln Ala Asp Val Glu Ala Ile Cys Lys Ala Val His | 185 | 190 | 195 |
| 596                                                         |     |     | 630 |
| ATC GAC GTC GAC CAG GCC ACC CTC GCC TTT GTG ATG GAG AGC GTT |     |     |     |
| Ile Asp Val Asp Val Ala Thr Leu Ala Phe Val Met Glu Ser Val | 200 | 205 | 210 |
| 641                                                         |     |     | 675 |
| ACG GGA CGC GAC GTG GCC ACC CTG ATC GCG GAG GGC GCC GCG AAG |     |     |     |
| Thr Gly Arg Asp Val Ala Thr Leu Ile Ala Glu Gly Ala Ala Lys | 215 | 220 | 225 |
| 676                                                         |     |     | 720 |
| ATG AGC GCG ATG CCG GCG GCC AGC TCT GGT GCC GCT GCT GCG GTC |     |     |     |
| Met Ser Ala Met Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Ala Gly Val | 230 | 235 | 240 |
| 721                                                         |     |     | 765 |
| ACT GCT TCC GCT GCG GGT GAT GCG GCT CCG GCT GCC GCC GCC GCG |     |     |     |
| Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Lys Lys Asp Glu Pro | 245 | 250 | 255 |
| 766                                                         |     |     | 810 |
| AAG AAG GAC GAG CCC GAG GAG GAG GCC GAC GAC GAC ATG GCG CCC |     |     |     |
| Thr Ala Ser Ala Ala Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Pro | 260 | 265 | 270 |

811  
 TCT AGA GTC GAC CCC ATG CAG TAC CTC GCC GCG TAC GCC CTC GTG  
 Ser Arg Val Asp Pro Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val  
 275 280 285

856  
 GCG CTG TCT GGC AAG ACG CCG TCG AAG GCG GAC GTT CAG GCT GTC  
 Ala Leu Ser Gly Lys Thr Pro Ser Lys Ala ASP Val Gln Ala Val  
 290 295 300

901  
 CTG AAG GCC GCC GGC GTT GCC GTG GAT GCC TCC CGC GTG GAT GCC  
 Leu Lys Ala Ala Gly Val Ala Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala  
 305 315 315

946  
 GTC TTC CAG GAG GTG GAG GGC AAG AGC TTC GAT GCG CTG GTG GCC  
 Val Phe Gln Glu Val Glu Gly Lys Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala  
 320 325 330

991  
 GAG GGC CGC ACG AAG CTG GTG GGC TCT GGC TCT GCC GCT CCT GCT  
 Glu Gly Arg Thr Lys Leu Val Gly Ser Gly Ser Ala Ala Pro Ala  
 335 340 345

1036  
 GGC GCT GTC TCC ACT GCT GGT GCC GGC GCT GGC GCG GTG GCC GAG  
 Gly Ala Val Ser Thr Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Glu  
 350 355 360

1081  
 GCG AAG AAG GAG GAG CCC GAG GAG GAG GAG GCC GAT GAT GAC ATG  
 Ala Lys Lys Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met  
 365 370 375

1136  
 GGC CCC GTC GAC CTG CAG CCC GCC GCT GCC GCG CCG GCC GCC CCT  
 Gly Pro Val Asp Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Pro  
 380 385 390

1171  
 AGC GCC GCT GCC AAG GAG GAG CCG GAG GAG AGC GAC GAG GAC GAC  
 Ser Ala Ala Ala Lys Glu Glu Pro Glu Glu Ser Asp Glu Asp Asp  
 395 400 405

TTC GGC ATG GGC GGT CTC TTC TAAGCGACTC GCCATCTCTT 1256  
 Phe Gly Met Gly Gly Leu Phe  
 410 412

1257  
 AGCCTCCTTG TGGTGCGCTT GAGGTGCTCT CGCTCTGCTT CTCCTTGACAG 1306

1307  
 TGTTGGCTGA CTCTGGCGGG TATGTGCCGT CGCATTACAC CCACCTCTCC 1356

1357  
 CACCCCTTTG CCCTACGCGC TCGCATGCGC AATCCGTGAA TCATCGAGGG 1406

1407

AAGTCTCTCT GGGTGGCAGT GGGTAAGCTT 1436

(SEQ ID NO.1 and SEQ ID NO.2)

ou um seu mutante ou fragmento que possam ser usados para gerar uma resposta imune protetora em um ser humano ou animal contra a leishmaniose, e a uma composição farmacêutica para a prevenção e tratamento, em seres humanos ou animais, da leishmaniose, compreendendo esta proteína ou um seu mutante ou fragmento que possam ser usados para gerar uma resposta imune protetora em um ser humano ou animal, contra a leishmaniose. Esta proteína é derivada da inserção do gene PQV no vetor de expressão pQE31. Aqui, dito gene quimérico preferivelmente codifica um polipeptídeo gerado com um peso molecular de 38 kD e um ponto isoelétrico de 7,37.

10 Igualmente, a invenção diz respeito a uma vacina capaz de estimular a produção de anticorpos que reconheçam o parasita da Leishmânia, compreendendo a proteína mencionada acima ou um seu mutante ou fragmento que possam ser usados para gerar uma resposta imune protetora em um ser humano ou animal, contra a leishmaniose.

15 Um outro aspecto da invenção abrange uma composição farmacêutica para a prevenção e tratamento, em seres humanos ou animais, de leishmaniose, compreendendo anticorpos dirigidos contra a proteína acima mencionada ou um seu mutante ou fragmento, preferivelmente contendo um ou mais determinantes antigênicos, tais como um epítipo.

20 A invenção ainda diz respeito a um processo para a prevenção ou tratamento da leishmaniose em um ser humano ou animal, compreendendo administrar ao ser humano ou animal uma composição farmacêutica como descrito acima, ou a um processo para prevenir a leishmaniose em um ser humano ou animal, compreendendo administrar ao ser humano ou animal uma vacina conforme descrito acima.

O gene quimérico formado das seqüências de DNA que

codificam os determinantes antigênicos de quatro proteínas de *L. infantum* e a proteína obtida, útil para prevenir e/ou tratar a leishmaniose, que a invenção propõe, por seu direito nato, constitui uma novidade óbvia dentro de seu campo de aplicação, já que, de acordo com a invenção, um gene quimérico sintético é produzido, o qual é obtido por montagem, contendo a região de DNA que codifica os determinantes antigênicos específicos às proteínas LiP2a, LiP2b, LiPO e H2A, assim construindo uma proteína rica em determinantes antigênicos. O gene quimérico obtido é expresso em *Escherichia coli* e o produto foi analisado em relação às suas propriedades antigênicas. Os resultados confirmam que esta proteína quimérica mantém todos os determinantes antigênicos das proteínas precursoras e que ela constitui um elemento relevante farmacologicamente útil para VL canina, com uma sensibilidade que oscila entre 80% a 93%, e uma especificidade entre 96% a 100%.

Mais particularmente, o gene quimérico formado pelas seqüências de DNA que codificam os determinantes antigênicos de quatro proteínas de *L. infantum* e a proteína codificada por ele, úteis para a prevenção e/ou tratamento de leishmaniose canina, e a proteína obtida objeto da invenção, é produzida por meio dos seguintes estágios, a saber:

- Construção do gene quimérico. Metodologia.

- Estratégia de clonagem.

- Clonagem de seqüências de DNA que codificam determinantes antigênicos da proteína histona H2A.

- Clonagem das seqüências que codificam rLiP2a-Q e rLiP2b-

- Q.

- Clonagem da seqüência rLiPO-Q.

- Clonagem do gene quimérico.

- Construção do gene quimérico da construção de produtos intermediários.

Clonagem de epítomos específicos aos antígenos de *L. infantum*.

- Construção do produto final.

5 Construção do gene quimérico que codifica um polipeptídeo que contém todos os determinantes antigênicos selecionados.

- opcionalmente, expressão da seqüência assim obtida.

- Avaliação do produto final.

Soros.

Purificação de proteínas

Eletroforese de proteínas e imunoanálise.

Medição por Fast ELISA.

- Avaliação do produto final.

Propriedades antigênicas.

15 Sensibilidade e especificidade da proteína quimérica CP no diagnóstico do soro de VL canina.

A estratégia seguida pela clonagem de seqüências de DNA que codifica cada um dos determinantes antigênicos selecionados é a mesma em todos os casos, e em uma primeira etapa, a seqüência de interesse é ampliada por meio de uma PCR e do uso de oligonucleotídeos específicos que contenham alvos para as enzimas de restrição nos extremos.

20 Quanto à etapa de clonagem, o produto amplificado é dirigido por meio da enzima de restrição apropriada e é inserido no sítio de restrição correspondente do plasmídeo pUC18.

25 Após a sequenciar o DNA, o inserto é recuperado e subclonado ao sítio de restrição correspondente do plasmídeo modificado denominado pMAL-c2. A modificação é produzida por inserção de um códon de terminação a jusante do alvo HindIII no poli-ligador de pMal-c2, designando o plasmídeo resultante pMAL-c2',

Quanto à clonagem da seqüência de DNA que codifica os

determinantes antigênicos da proteína histona H2A, deve ser salientado que o cDNA do clone cL71, que codifica a histona H2A de *L. infantum*, é usado como um gabarito para as reações de PCR, e para a amplificação de DNA, que codifica a região N-terminal da histona H2A, mais exatamente rLiH2A-Nt-Q, os seguintes oligonucleotídeos são usados: sentido 5'-**CCTTTAGCTA** CTCCTCGCAGCGCCAAG-3' (posição 84 a 104 da sequência cL71); anti-sentido 5'-**CCTGGGGGCGCCAGAGGCACCGATGCG**-3' (inverso e complementar às posições 204 a 224 da sequência cL71).

As sequências que são incluídas nos oligonucleotídeos para a clonagem e que não estão presentes na sequência precursora cL-71, estão marcadas com tipos em negrito.

O fragmento de DNA amplificado é clonado diretamente do sítio de restrição XmnI de pMAI-c2'.

O fragmento é sequenciado por meio do iniciador #1234 male, e da região C-terminal antigênica da histona H2A, em particular rLiH2A-Ct-Q, é amplificado com os seguintes oligonucleotídeos. Estes são:

Sentido, 5'-GAATTCTCCGTAAGGCGGCCGCGCAG-3' (posição 276 a 296 da sequência cL71).

Anti-sentido, 5'-GAATTCGGGCGCGCTCGGTGTCGCC TTGCC-3' (inverso e complementar às posições 456 a 476 do plasmídeo cL71).

Um triplete que codifica a prolina (indicado como GGG após as letras sublinhadas) é incluído no oligonucleotídeo anti-sentido, o sítio de restrição EccRI que é incluído em ambos os oligonucleotídeos para clonagem é indicado pelo sublinhado.

Com respeito à clonagem das sequências que codificam rLiP2a-Q, deve ser salientado que as regiões de interesse são ampliadas por PCR a partir dos cDNAs que codificam LiP2a e LiP2b.

Os oligonucleotídeos que são usados para construir o clone de

expressão LiP2a-Q, são os seguintes:

Sentido, 5'-GTCGACCCCATGCAGTACCTCGCCGCGTAC-3'

Anti-sentido, 5'-GTCGACGGGGCCCATGTCATCATCGGCC TC-3'.

Deve ser salientado que os sítios de restrição SalI adicionados aos extremos 5' dos oligonucleotídeos foram sublinhados.

Quando da construção do clone de expressão LiP2b-Q, os oligonucleotídeos usados foram:

Sentido, 5'-TCTAGACCCCGCCATGTCGTCGTCCTTCCTCGC C-3'.

Anti-sentido, TCTAGAGGGGGCCCATGTCGTCGTCGGCCTC-3'.

Nos extremos 5' dos oligonucleotídeos, os sítios de restrições são incluídos para a enzima XbaI (sublinhados), e devido às necessidades de clonagem, um tripleto adicional, codificando um resíduo de prolina, é incluído a jusante do sítio de restrição.

Com respeito à clonagem da sequência rLiPO-Q, deve ser salientado que a clonagem da sequência de DNA da região C-terminal da proteína PO de *L. infantum* é realizada pela amplificação de um clone de cDNA denominado L27, e os seguintes oligonucleotídeos:

Sentido, 5'-CTGCAGCCCGCCGCTGCCGCGCCGGC CGCC-3' (posições de 1 a 24 do cDNA L27) e o iniciador da sequência pUC18 (#1211), o DNA amplificado é dirigido pelas enzimas PstI+HindIII, com a última inserção no plasmídeo pMAL-c2.

O clone resultante é denominado pPQI e deve ser observado que o sítio de restrição PstI é incluído no nucleotídeo com sentido (sequência sublinhada) e que o alvo de restrição HindIII está presente no cDNA L27.

Com respeito à clonagem do gene quimérico, deve ser salientado que as sequências de DNA que codificam os cinco determinantes antigênicos são montados em um gene quimérico, e esta montagem é realizada no clone pPQI, para o qual as regiões codificadoras para as regiões antigênicas LiP2a-Q são adicionadas sequencialmente na direção 3'

(designando os resultados da clonagem de pPQII), LiP2b-Q (clone pPQIII), LiH2a-Ct-Q (clone pPQIV) e LiH2A-Nt-Q (clone pPQV).

Finalmente, o inserto obtido após a digestão de SacI+HindIII do clone final pPQV é inserido no plasmídeo de expressão PQE31, designando o clone resultante de pPQ.

#### DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Para completar a descrição que está sendo feita, e com o objetivo de ajuvante o entendimento das características da invenção, o presente relatório é acompanhado, como uma sua parte integral, por um conjunto de desenhos de natureza ilustrativa, que não são limitativos. O seguinte é representado:

Figura 1. Corresponde à expressão (A), à purificação nas colunas de amilose (B) e à antigenicidade (C: mancha do Oeste; D: ELISA) de cada uma das proteínas recombinantes fundidas à proteína de ligação da maltose. A figura sob D também apresenta a reatividade no ELISA de cada uma das proteínas recombinantes relativas à proteína completa.

Figura 2. Representação gráfica dos diferentes vetores considerados para se obter o gene quimérico objeto da invenção, do qual a proteína pertinente destinada a realizar um diagnóstico preciso em animais ou seres humanos que apresentem sintomas de leishmaniose, será extraída.

Figura 3. Corresponde à identificação da proteína obtida do gene quimérico fundido à proteína MBP, cuja preparação é representada na Figura 2.

Figura 4. Corresponde à expressão (A), purificação em colunas de amilose (B) e a antigenicidade (C: mancha do Oeste; F: ELISA) dos intermediários e da proteína quimérica final fundida à proteína de ligação da maltose (PQI-PGV). A figura também representa a expressão da proteína quimérica (D coluna 1), purificação em colunas de agarose Ni-Nt (D coluna 2) e a antigenicidade da proteína purificada contra um soro da VL (E: mancha

do Oeste) e contra uma coleção de soros (F: PQ no ELISA).

Figura 5. Mostra finalmente uma representação gráfica sintetizada da reatividade de uma ampla variedade de soros caninos, dividida em três grupos. O primeiro grupo contém animais com infecção real por *L. infantum*. O segundo grupo inclui soro obtido de cães com vários sintomas clínicos, mas que não se acham infectados com Leishmânia, e um terceiro grupo é composto de quinze soros de controle de cães saudáveis. Esta figura demonstra o valor da invenção para realizar diagnóstico sorológico da VL.

#### MODALIDADE PREFERIDA DA INVENÇÃO

O gene quimérico formado das seqüências de DNA que codificam os determinantes antigênicos de quatro proteínas de *L. infantum*, úteis para o diagnóstico sorológico de leishmaniose canina, e a proteína obtida que está sendo proposta, são constituídas da construção de produtos intermediários. Em um primeiro exemplo, a clonagem de epítomos específicos aos antígenos de *L. infantum* é realizada, o que é configurado na base de estudos anteriores sobre as propriedades antigênicas de quatro antígenos protéicos de *L. infantum* (LiP2a, PiPO, LiP2b, LiH2a), que possibilitam a existência de epítomos B a serem definidos para estas proteínas, e que são especificamente reconhecidos pelos soros caninos de VL.

Com vistas a melhorar a especificidade destes antígenos com respeito às proteínas de *L. infantum*, os determinantes antigênicos específicos são clonados destas proteínas. Após deletar certas regiões destas proteínas, estas podem ser reconhecidas por soros de animais que sejam portadores da VL e de outras doenças diferentes.

Mediante o uso dos oligonucleotídeos específicos e da amplificação por PCR de regiões específicas aos genes LiP2a, LiP2b, PO e H2A, são construídos diversos clones que expressam as proteínas recombinantes rLiPO-Ct-Q, rLiP2a-Q, rLiP2b-Q, rLiH2A-Ct-Q e rLiH2A-Nt-Q, justamente como foi detalhado na descrição da invenção quanto à

metodologia, onde os detalhes da clonagem são descritos.

As proteínas recombinantes usadas são as seguintes:

- rLiPO-Ct-Q, que corresponde aos 30 resíduos C-terminais da proteína ribossômica LiPO.

5 - rLiP2a-Q e rLiP2b-Q, que são derivadas das proteínas ribossômicas LiP2a e LiP2b, respectivamente.

- Duas sub-regiões da histona H2A, que correspondem aos 46 resíduos de término N (xLiH2A-Nt-Q), e aos 67 resíduos de término C [resíduos (xLiH2A-Ct-Q)].

10 Cada uma das proteínas recombinantes fundidas à proteína de ligação da maltose (MBP) é expressa em *E. coli*, conforme representado na Figura número 1A, e elas foram purificadas por cromatografia de afinidade em uma coluna B de amilose. Depois, o processo de eletroforese de purificação foi realizado nas proteínas recombinantes (colunas 1 a 5).

15 Com o objetivo de analisar se as proteínas recombinantes foram reconhecidas pelos soros caninos de VL, um *Western-blot* foi incubado, contendo as proteínas recombinantes em uma mistura de três soros caninos de VL. Dado que todas estas proteínas são reconhecidas pelos soros, conclui-se que os determinantes antigênicos presentes nas proteínas precursoras são mantidos nas proteínas recombinantes (C).

20 As propriedades antigênicas das proteínas recombinantes são comparadas com os determinantes antigênicos dos antígenos precursores, por meio de um FAST ELISA, testando em relação a uma coleção de 26 soros caninos de VL, justamente como é mostrado na seção da Figura número 1D, e  
25 o fato de que os soros mostraram um valor de reatividade semelhante, ambos em relação às regiões antigênicas selecionadas e às proteínas completas correspondentes, demonstra que nenhuma alteração ao epítipo antigênico havia ocorrido durante o procedimento de clonagem.

Com respeito à construção do produto final, mais exatamente

do gene quimérico que codifica um polipeptídeo que contém todos os determinantes antigênicos selecionados, deve ser salientado que a estratégia de clonagem é indicada em seguida à Figura número 2, seção A. Os produtos intermediários gerados durante o processo são mostrados.

5 Um clone que expressa as proteínas rLiPO-Ct-Q (pPQI) é usado como o vetor inicial, e os fragmentos de DNA que codificam as proteínas rLiPO-Ct-Q, rLiP2a-Q, rLiP2b-Q, rLiH2A-Ct-Q e rLiH2A-Nt-Q são adicionados seqüencialmente usando-se sítios de restrição apropriados.

10 Após cada etapa de clonagem, a orientação correta de cada um dos insertos é deduzida do tamanho dos produtos de expressão, e finalmente a seqüência completa de nucleotídeos do clone final pPQV é determinada e a seqüência de aminoácidos deduzida da seqüência representada na Figura número 3.

15 O polipeptídeo gerado tem uma massa molecular de 38 kD, com um ponto isoelétrico de 7,37, incluindo as seqüências espaçadoras codificando a prolina, sublinhadas na Figura número 3. O objetivo de assim proceder é separar eficientemente os domínios antigênicos e evitar possíveis conformações terciárias que poderiam interferir com a estabilidade e antigenicidade do produto final.

20 A expressão e recuperação de cada um dos produtos intermediários são mostradas na Figura número 4, quadros A e B. Como era esperado, após cada adição, o tamanho do produto de expressão no vetor pMAL gradualmente aumenta até alcançar um peso molecular de 80 kDa, observando-se um certo grau de ruptura durante a purificação.

25 O gene quimérico também foi clonado no plasmídeo pQE, um vetor que permite a expressão de proteínas com um fragmento de 6 histidinas no término N extremo. O clone resultante e as proteínas recombinantes são denominadas pPQ e PQ, respectivamente.

O nível de expressão da proteína nas bactérias transformadas

com o plasmídeo pPQ e as proteínas purificadas são mostradas na Figura número 4, referida em particular com um D, com a proteína PQ, purificada por cromatografia de afinidade em condições de desnaturação, sendo mais estável do que a proteína recombinante pPQV representada na Figura número 4, no quadro D, coluna 2.

De modo a avaliar o produto final, uma série de materiais foi usada, e, obviamente, algumas técnicas, como é descrito abaixo.

Os soros de VL obtidos de cães de diferentes origens são usados. Os animais são avaliados clinicamente e analiticamente no laboratório pertinente, geralmente em um Departamento de Parasitologia, e todos os soros positivos são ensaiados quanto à imunofluorescência indireta (IIF).

A presença de amastigotos dos parasitas destes animais é confirmada por observação direta dos linfonodos poplíteos e pré-escapulares, e a um segundo grupo de 33 soros de VL originários de outras regiões, foram dados diagnósticos positivos no ELISA em relação aos extratos protéicos totais do parasita e/ou por IIF.

Os soros de cães afetados por diferentes doenças que não eram VL, são obtidos de diferentes origens. Dentro deste grupo, soros das seguintes infecções são encontrados:

*Mesocestoides spp.*

*Dyphylidium caninum*

*Uncinaria stenocephala*

*Toxocara canis*

*Dipetalonema dranunculoides*

*Demodex canis*

*Babesia canis*

*Ehrlichia canis*

*Rickettsia rickettsiae*

O restante dos soros foram obtidos de cães que apresentavam

vários sintomas clínicos que não eram relacionados com qualquer processo infeccioso, e os controles do soro foram obtidos de quinze animais saudáveis cuidadosamente controlados.

5 A purificação das proteínas recombinantes expressas pelos clones pMA1-c2 é realizada por cromatografia de afinidade em colunas de amilose, e a purificação da proteína recombinante expressa pelo clone pPQ foi realizada em colunas de resina Ni-NTA em condições de desnaturação (Qiagen).

10 Para analisar as proteínas, a eletroforese em géis de poliacrilamida a 10% na presença de SDS foi realizada sob condições padrão. A análise imunológica das proteínas separadas por eletroforese foi realizada sobre membranas de nitrocelulose, para as quais as proteínas haviam sido transferidas. As proteínas transferidas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% seco em um tampão de PBS com Tween 20 a 0,5%.

15 Os filtros foram seqüencialmente colocados em contato com anti-soro primário e secundário em soluções de bloqueio e um imunoconjugado ligado a peroxidase foi usado como segundo anticorpo, visualizando-se a ligação específica por meio de um sistema ECL. A Figura 4E mostra um *Western-blot* da proteína PQ.

20 O Fast-ELISA foi usado no lugar do ELISA clássico, e a sensibilização do antígeno foi realizado por 12 horas em temperatura ambiente.

As placas foram sensibilizadas com 100 µl de antígeno, cuja concentração, em todos os casos, foi de 2 µg/ml.

25 Após a sensibilização, os reservatórios das placas foram incubados por 1 hora com solução de bloqueio (leite desnatado em pó a 0,5% dissolvido em PBS - Tween 20 a 0,5% e os soros foram diluídos trezentas vezes em solução de bloqueio).

Os reservatórios foram incubados com soro durante 2 horas

em temperatura ambiente, e após exposição ao anticorpo eles foram lavados com PBS-Tween 20.

Os anticorpos ligados a peroxidase foram usados como segundos anticorpos em uma diluição de 1:2000 e a cor da reação foi desenvolvida usando-se o substrato ortofenilenodiamina, medindo-se a absorção em 450 nm.

Com referência à avaliação do produto final, deve ser salientado que as propriedades antigênicas foram determinadas por meio do estudo pertinente da reatividade dos soros caninos de VL contra a proteína quimérica e contra cada um dos produtos intermediários em um ensaio de “*Western-blot*”. Todos os produtos intermediários mantiveram sua antigenicidade, assim como o produto final pPQV, durante todo o processo da clonagem (Figura 4C).

Deve-se salientar que a proteína recombinante expressa pelo plasmídeo pPQ foi reconhecida pelos soros de VL. Com vistas a analisar com maior precisão as propriedades antigênicas da proteína quimérica e dos produtos intermediários, uma análise da reatividade de uma ampla variedade de soros caninos de VL foi realizada por meio de um fast-ELISA em comparação com as proteínas recombinantes, como é mostrado na seção F da Figura número 4. Pode-se dar realce ao fato de que a sensibilidade dos produtos intermediários de clonagem diferentes aumenta após cada etapa de adição. Deve igualmente ser salientado que a proteína pQI é reconhecida pela maioria dos soros de VL e a proteína PQII igualmente pela maioria dos soros. Esta proporção é maior quanto à proteína PQIII, e as proteínas PQIV, PQV e PQ são reconhecidas por praticamente todos os soros.

De acordo com o que foi examinado acima, o percentual de reconhecimento apresentado pelos soros foi semelhante tanto no caso de ensaios das proteínas quiméricas PQV e PQ, quando de ensaios de uma mistura de proteínas recombinantes rLiPO-Ct-Q, rLiP2a, rLiP2b e rLiH2A.

Foi observado que as propriedades antigênicas de cada uma das 5 regiões antigênicas selecionadas estão presentes no produto de expressão de PQ e, portanto, este produto pode ser usado para diagnóstico, ao invés de uma mistura dos antígenos expressos individualmente.

Com vistas a determinar se a proteína quimérica pode ser usada para o diagnóstico de soros de VL caninos, e de acordo com a análise pertinente de uma ampla variedade de soros caninos em comparação com esta proteína, tendo em mente que, de acordo com as características clínicas dos animais, os soros caninos foram classificados em três grupos. Um primeiro grupo consistiu de soros de cães com uma real infecção de *L. infantum*. Um segundo grupo foi composto de soros de cães que tinham vários sintomas clínicos sem serem infetados com a leishmânia, incluindo cães infetados com parasitas diferentes da leishmânia, e que apresentassem sintomas clínicos que pudessem ser confundidos com aqueles observados durante a leishmaniose.

O terceiro grupo foi composto de soros de controle, originados de cães saudáveis.

Na Figura número 5, os valores médios de reatividade são mostrados para cada grupo de soros, a reatividade dos soros de VL alcançando um valor de reatividade média de 0,8 (S.D. = 0,4).

Dentro deste grupo, a reatividade de 12 soros foi positiva, mas menor do que 0,35, enquanto a reatividade alcançou valores entre 0,35 e 0,5. Foi observado que a reatividade de 23 soros varia entre 0,5 e 1,0, com 14 soros apresentando uma reatividade maior do que 1,0.

O valor médio de absorção dos soros do segundo grupo, isto é, do grupo infetado com parasitas diferentes dos parasitas de leishmânia, é de 0,2 (S.D. = 0,05), e a reatividade dos soros de controle, isto é, do terceiro grupo, é de 0,1 (S.D. = 0,003). Apenas dois soros do grupo 2 apresentaram reatividade entre 0,35 e 0,40.

Os dados apresentados acima indicam que a proteína

quimérica PQ no FAST ELISA tem uma sensibilidade de 80% para o diagnóstico da VL, se o valor de corte for definido como o valor médio da reatividade dos soros do grupo 2, mais três S.D.'s (isto é, 0,35).

A sensibilidade do grupo ensaiado alcança os 93%, se o valor de corte for definido pelos valores da reatividade do grupo de controle. A proteína Q tem uma especificidade de 96% para o diagnóstico de VL, quando o valor do corte for definido pelos soros acima mencionados do grupo 2. 100% de especificidade no ensaio foram obtidos quando os valores da reatividade de cães saudáveis foram considerados.

O processo a ser usado é o seguinte:

1. As placas de microtitulação são cobertas com anticorpos por 100 µl incubados de uma solução que contém 1 µg/ml de antígeno dissolvido em um tampão de PBS - Tween-20 0,5% - leite desnatado 5% (tampão A).

A incubação é realizada por 12 horas em temperatura ambiente e, depois, as placas são lavadas por três vezes como o mesmo tampão sem qualquer antígeno. As placas com antígeno secas podem ser mantidas em temperatura ambiente.

2. Uma primeira incubação dos reservatórios foi realizada com o soro de animal em uma diluição de 1/200 no tampão A. A incubação dura 1 hora.

3. Os reservatórios são lavados com tampão A, como descrito no ponto 1, por três vezes com um frasco de lavagem.

4. Eles são incubados com um segundo anticorpo (IgG ligado a peróxidase) diluído a 1:2000 em tampão A, realizando a incubação por 1 hora.

5. Os reservatórios são lavados mais uma vez com tampão A por três vezes, como foi indicado na terceira seção, isto é, com um frasco de lavagem.

6. A reatividade é revelada usando-se o substrato ortofenilenodiamina e a absorção é medida em 450 nm.

A proteína usada para o diagnóstico, extraída do gene quimérico, identificada, e a sequência de nucleotídeos, são como segue:

|    |                                                 |                     |     |
|----|-------------------------------------------------|---------------------|-----|
| 1  | ATG AGA GGA TCT CAC CAC CAC CAC CAC CAC         | ACG GAT CCG CAT GCG | 45  |
|    | Met Arg Gly Ser His His His His His His         | Thr Asp Pro His Ala |     |
|    | 5                                               | 10                  | 15  |
| 46 | AGC TCG AAC AAC AAC AAC AAT AAC AAT AAC AAC AAC | CTC GGG ATC         | 90  |
|    | Ser Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn | Leu Gly Ile         |     |
|    | 20                                              | 25                  | 30  |
| 91 |                                                 |                     | 135 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GAG | GGA | AGG | CCT | TTA | GCT | ACT | CCT | CGC | AGC | GCC | AAG | AAG | GCC | GTC |     |
| Glu | Gly | Arg | Pro | Leu | Ala | Thr | Pro | Arg | Ser | Ala | Lys | Lys | Ala | Val |     |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |
| 136 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| CGC | AAG | AGC | GGC | TCC | AAG | TCC | GCG | AAA | TGT | GGT | CTG | ATC | TTC | CCG | 180 |
| Arg | Lys | Ser | Gly | Ser | Lys | Ser | Ala | Lys | Cys | Gly | Leu | Ile | Phe | Pro | 60  |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     |     |
| 181 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GTG | GGC | CGC | GTC | GGC | GGG | ATG | ATG | CGC | CGC | GGC | CAG | TAC | GCT | CCG | 225 |
| Val | Gly | Arg | Val | Gly | Gly | Met | Met | Arg | Arg | Gly | Gln | Tyr | Ala | Arg | 75  |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     |     |
| 226 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| CGC | ATC | GGT | GCC | TCT | GGC | GCC | CCC | AGG | ATT | TCA | GAA | TTC | TCC | GTG | 270 |
| Arg | Ile | Gly | Ala | Ser | Gly | Ala | Pro | Arg | Ile | Ser | Glu | Phe | Ser | Val | 90  |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     |     |
| 271 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| AAG | GCG | GCC | GCG | CAG | AGC | GGG | AAG | AAG | CGG | TGC | CGC | CTG | AAC | CCG | 315 |
| Lys | Ala | Ala | Ala | Gln | Ser | Gly | Lys | Lys | Arg | Cys | Arg | Leu | Asn | Pro | 105 |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     |     |     |
| 316 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| CGC | ACC | GTG | ATG | CTG | GCC | GCG | CGC | CAC | GAC | GAC | GAC | ATC | GGC | ACG | 360 |
| Arg | Thr | Val | Met | Leu | Ala | Ala | Arg | His | Asp | Asp | Asp | Ile | Gly | Thr | 120 |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     |     |     |
| 361 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| CTT | CTG | AAG | AAC | GTG | ACC | TTG | TCT | CAC | AGC | GGC | GTT | GTG | CCG | AAC | 405 |
| Leu | Leu | Lys | Asn | Val | Thr | Leu | Ser | His | Ser | Gly | Val | Val | Pro | Asn | 135 |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     |     |     |
| 406 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ATC | AGC | AAG | GCG | ATG | GCA | AAG | AAG | AAG | GGC | GGC | AAG | AAG | GCC | AAG | 450 |
| Ile | Ser | Lys | Ala | Met | Ala | Lys | Lys | Lys | Gly | Gly | Lys | Lys | Gly | Lys | 150 |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     |     |     |
| 391 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GCG | ACA | CCG | AGC | GCG | CCC | GAA | TTC | GGA | TCC | TCT | AGA | CCC | ATG | TCC | 495 |
| Ala | Thr | Pro | Ser | Ala | Pro | Glu | Phe | Gly | Ser | Ser | Arg | Pro | Met | Ser | 165 |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     |     |     |
| 496 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ACC | AAG | TAC | CTC | GCC | GCG | TAC | GCT | CTG | GCC | TCC | CTG | AGC | AAG | GCG | 540 |
| Thr | Lys | Tyr | Leu | Ala | Ala | Tyr | Ala | Leu | Ala | Ser | Leu | Ser | Lys | Ala | 180 |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |
| 541 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| TCC | CCG | TCT | CAG | GCG | GAC | GTG | GAG | GCT | ATC | TGC | AAG | GCC | GTC | CAC | 585 |
| Ser | Pro | Ser | Gln | Ala | Asp | Val | Glu | Ala | Ile | Cys | Lys | Ala | Val | His | 195 |
|     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |
| 596 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ATC | GAC | GTC | GAC | CAG | GCC | ACC | CTC | GCC | TTT | GTG | ATG | GAG | AGC | GTT | 630 |
| Ile | Asp | Val | Asp | Gln | Ala | Thr | Leu | Ala | Phe | Val | Met | Glu | Ser | Val | 210 |
|     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |     |

641  
 ACG GGA CGC GAC GTG GCC ACC CTG ATC GCG GAG GGC GCC GCG AAG 675  
 Thr Gly Arg Asp Val Ala Thr Leu Ile Ala Glu Gly Ala Ala Lys  
 215 220 225

676  
 ATG AGC GCG ATG CCG GCG GCC AGC TCT GGT GCC GCT GCT GGC GTC 720  
 Met Ser Ala Met Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Ala Gly Val  
 230 235 240

721  
 ACT GCT TCC GCT GCG GGT GAT GCG GCT CCG GCT GCC GCC GCC GCG 765  
 Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Lys Lys Asp Glu Pro  
 245 250 255

766  
 AAG AAG GAC GAG CCC GAG GAG GAG GCC GAC GAC GAC ATG GGC 810  
 Thr Ala Ser Ala Ala Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Pro  
 260 265 270

811  
 TCT AGA GTC GAC CCC ATG CAG TAC CTC GCC GCG TAC GCC CTC GTG 855  
 Ser Arg Val Asp Pro Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val  
 275 280 285

856  
 GCG CTG TCT GGC AAG ACG CCG TCG AAG GCG GAC GTT CAG GCT GTC 900  
 Ala Leu Ser Gly Lys Thr Pro Ser Lys Ala Asp Val Gln Ala Val  
 290 295 300

901  
 CTG AAG GCC GCC GGC GTT GCC GTG GAT GCC TCC CGC GTG GAT GCC 945  
 Leu Lys Ala Ala Gly Val Ala Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala  
 305 315 315

946  
 GTC TTC CAG GAG GTG GAG GGC AAG AGC TTC GAT GCG CTG GTG GCC 990  
 Val Phe Gln Glu Val Glu Gly Lys Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala  
 320 325 330

991  
 GAG GGC CGC ACG AAG CTG GTG GGC TCT GGC TCT GCC GCT CCT GCT 1035  
 Glu Gly Arg Thr Lys Leu Val Gly Ser Gly Ser Ala Ala Pro Ala  
 335 340 345

1036  
 GGC GCT GTC TCC ACT GCT GGT GCC GGC GCT GGC GCG GTG GCC GAG 1080  
 Gly Ala Val Ser Thr Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Glu  
 350 355 360

1081  
 GCG AAG AAG GAG GAG CCC GAG GAG GAG GAG GCC GAT GAT GAC ATG 1125  
 Ala Lys Lys Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met  
 365 370 375

1136  
 GGC CCC GTC GAC CTG CAG CCC GCC GCT GCC GCG CCG GCC GCC CCT 1170  
 Gly Pro Val Asp Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Pro  
 380 385 390

```

1171                               1215
AGC GCC GCT GCC AAG GAG GAG CCG GAG GAG AGC GAC GAG GAC GAC
Ser Ala Ala Ala Lys Glu Glu Pro Glu Glu Ser Asp Glu Asp Asp
                               395                               400                               405

TTC GGC ATG GGC GGT CTC TTC TAAGCGACTC GCCATCTCTT                               1256
Phe Gly Met Gly Gly Leu Phe
                               410                               412

1258
AGCCTCCTTG TGGTGCGCTT GAGGTGCTCT CGCTCTGCTT CTCCTTGCAG 1306

1307
TGTGTGGCTGA CTCTGGCGGG TATGTGCCGT CGCATTACAC CCACCTCTCC 1356

1357
CACCCCTTTG CCCTACGCGC TCGCATGCGC AATCCGTGAA TCATCGAGGG 1406

1407
AAGTCTCTCT GGGTGGCAGT GGGTAAGCTT                               1436

(SEQ ID NO.1 e SEQ ID NO.2)

```

Não se considera necessário estender esta descrição para que alguém versado na técnica possa entender o escopo da invenção e as vantagens que ela confere.

Os materiais, a forma, o tamanho e a disposição dos elementos são suscetíveis de mudança, contanto que isso não suponha uma mudança na essência da invenção.

Os termos em que este relatório descritivo foi escrito devem sempre ser considerados bem amplos por natureza, e não limitativos.

#### VACINA CONTRA A LEISHMÂNIA

#### 10 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os parasitas protozoários do gênero *Leishmania* são responsáveis pela leishmaniose, uma doença sintomaticamente complexa que afeta essencialmente os homens e os animais nas regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que o número de novos casos de leishmaniose visceral humana possa alcançar a cifra de 500.000, estando afetadas um

15 mínimo de várias dezenas de milhões de pessoas. Adicionalmente, o número

de leishmaniose cutânea e mucocutânea pode ser da ordem de 2.000.000 por ano (Modabber., 1990). Não obstante as pessoas em risco de contrair os diferentes tipos de leishmaniose possa ser estimado em cerca de 350 milhões, o número de pessoas com a real infecção pode ser muito maior, devido ao fato de que não existem estimativas claras dos casos reais de infecções assintomáticas e por causa da existência de infecções crípticas. De fato, a leishmaniose pode ser considerada dentro do contexto global como uma infecção/doença de natureza endêmica, situada entre os 4º e 5º lugares na classificação das doenças parasíticas com repercussão mundial.

Três formas principais de leishmaniose podem ser consideradas: a cutânea, a mucocutânea e a visceral, cujas características principalmente dependem da localização do parasita, da espécie à qual ele pertence e das manifestações clínicas que ele produz. As espécies distribuídas ao longo da Ásia e de certas regiões da área do Mar Mediterrâneo dão ensejo à presença da forma cutânea, com ulceração localizada que, em muitos casos, se cura espontaneamente. Estas manifestações são causadas por *L. major* e *L. tropica*. A *L. aethiopica* (Mar Mediterrâneo, Ásia, África) também induz à forma cutânea de leishmaniose, embora sua manifestação seja mais difundida. Na América, a espécie *L. mexicana* produz a forma cutânea com uma localização generalizada que comumente não se cura espontaneamente. A forma mucocutânea da doença em seres humanos é causada pela *L. brasiliensis* e é caracterizada pela presença de lesões cutâneas nas regiões oronasais e faríngea, acarretando a destruição das mucosas. Na América, Europa, África e Ásia, a forma mais freqüente de leishmaniose é a forma visceral, causada por *L. chagasi*, *L. donovani* e *L. infantum*. Esta forma de leishmaniose é caracterizada por sintomas clínicos associados a febre, anemia e uma intensa hepatosplenomegalia, que é letal se não for tratada adequadamente no tempo certo. Na forma avançada da doença, o hospede é incapaz de desenvolver uma resposta imune efetiva. Todas estas formas de

leishmaniose são também detectadas em canídeos e alguns roedores que, de fato, constituem os principais reservatórios do parasita. O problema de saúde gerado pela *L. infantum* na bacia do Mediterrâneo é sério, porque existe uma alta incidência da infecção/doença em cães, e o inseto vetor é muito propagado. Calcula-se que entre 7% e 20% de todos os canídeos estejam infectados pela Leishmânia, alcançando os 30% em algumas áreas da Espanha, onde ela é endêmica. Este fato constitui um sério problema veterinário que, adicionalmente, aumenta o risco de contágio, fundamentalmente por pessoas imunossupressivas. Na Europa, existem alguns 11 milhões de cães em risco de infecção por *Leishmania*.

A *L. infantum*, como o restante das espécies no gênero, tem um ciclo biológico dimórfico. Os hospedeiros intermediários são insetos da família dos *Psychodidae*, gênero *Phlebotomus*. Na área européia do Mediterrâneo, foi demonstrado que as espécies *P. arias* e *P. perniciosus* são os vetores principais, embora os vetores *P. papatosi*, *P. longicuspis* e *P. sergenti* também estejam presentes. Quando o parasita é ingerido pelo vetor junto com o sangue de um hospedeiro vertebrado, ele se localiza no tubo digestivo em uma forma extracelular, transforma-se em um promastigoto e se divide. As formas infecciosas migram em direção à faringe e ao probóscide, de onde elas serão inoculadas em um novo hospedeiro vertebrado. Os promastigotos são caracterizados no fato de que eles têm um flagelo e uma forma alongada de alguns 15 a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento, com uma extremidade posterior arredondada e uma extremidade anterior pontuda. O núcleo fica situado na posição central e o cinetoplasto na extremidade anterior. Em meios de cultura, os parasitas apresentam um certo grau de variabilidade morfológica. Após a inoculação dos promastigotos na pele do hospedeiro vertebrado, o estabelecimento, ou não, da infecção depende essencialmente de dois fatores: a existência de uma população celular adequada – macrófagos – e outras células do sistema mononuclear fagocítico, e a

capacidade do parasita de sobreviver e multiplicar-se no interior destas células.

A primeira etapa na penetração de *Leishmania* nos macrófagos é a aproximação e aderência à membrana plasmática da célula alvo. Estudos *in vitro* parecem indicar que não existe qualquer atração quimiostática direta dos promastigotos sobre os macrófagos. Dentro do ambiente dos tecidos, os promastigotos livres ativam o complemento pela trajetória alternativa, realizando a formação de um gradiente de concentração da fração C5a, que atrai os macrófagos e outras células inflamatórias em direção ao sítio de inoculação. Uma vez o promastigoto esteja dentro de um vacúolo parasitóforo, os lisossomas se fundem a ele formando um fagolisossomo. Em infecções causadas por outros microorganismos, o fagolisossomo é a organela responsável pela lise e eliminação por meio de vários mecanismos, tais como a produção de radicais tóxicos de oxigênio, por um processo metabólico oxidativo, a ação de enzimas lisossômicas hidrolíticas, proteínas catiônicas, e pH baixo. A sobrevivência do parasita no fagolisossomo é uma função de sua capacidade para resistir e evitar ditos mecanismos.

A existência de uma resposta imune contra a parasitação por *Leishmania*, que é tanto humoral quanto celular, foi descoberta a partir dos primeiros momentos em que a doença foi estudada, e tem sido revista em numerosas ocasiões. O tipo de resposta humoral depende da forma de leishmaniose. Na forma cutânea, a resposta humoral é muito fraca, enquanto no tipo visceral uma alta resposta de anticorpos é observada. Nas afecções cutâneas, existe uma notável resposta de mediação celular, detectável tanto *in vivo* por meio de testes de hipersensibilidade do tipo retardado (DTH), quanto *in vitro* por meio de testes de transformação linfoblástica e testes de inibição da migração de macrófagos. Nestes casos, o título dos anticorpos do soro é normalmente baixo e diretamente relacionado com a seriedade do processo. Uma vez os amastigotos estejam dentro dos macrófagos, a resolução da

infecção depende essencialmente dos mecanismos imunes de mediação celular. A resposta celular é determinada pela ação de junção dos macrófagos, das células B, das várias subpopulações de células T, e das diferentes linfocinas secretadas por todos eles. O macrófago parasitado processa os antígenos da *Leishmania* e expressa-os em sua superfície por um processo mediado pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II (CPH-II). Adicionalmente, o macrófago secreta IL-1, que atua como um segundo sinal ativador para o linfócito T. Nos seres humanos, a leishmaniose visceral ou calazar é caracterizada por uma resposta celular ausente, detectável tanto pela ausência da hipersensibilidade retardada (DTH) quanto pelos processos de proliferação celular. A ausência de proliferação de células T é detectada até na presença de mitógenos tais como a concanavalina A ou a fitoemaglutinina e da inibição na produção de IL-2 pelas células T estimuladas.

Em camundongos, a população de linfócitos T (fenótipo CD4) é heterogênea e pode ser dividida em pelo menos duas subpopulações de acordo com as linfocinas que eles produzem. Estas células são essenciais no desenvolvimento de imunidade protetora contra a leishmaniose cutânea (subpopulação Th-1) e são, ao mesmo tempo, envolvidas na supressão da resposta imune protetora (subpopulação Th-2), as células T induzidas em camundongos resistentes C57BL/6 ou camundongos BALB/C curados são predominantemente do tipo Th-1 ou Th-2. Em geral, as linfocinas secretadas por estas células favorecem o desenvolvimento da linhagem celular que as produz e tem um efeito antagônico sobre o desenvolvimento da outra subpopulação. Assim sendo, IL-4 e IL-10 produzidos pelas células Th-2 contribuem para a progressão da infecção, favorecendo o desenvolvimento desta linhagem. Adicionalmente, elas podem atuar diretamente sobre o macrófago, não permitindo sua ativação. Entretanto, em camundongos suscetíveis de infecção por *Leishmania*, deficientes no gene que codifica IL-

4, resultados contraditórios têm sido obtidos. Em alguns casos, tem sido observado que a ausência desta citocina redireciona a resposta e aumenta a resistência à infecção, enquanto, em outros, nenhuma diferença é observada no nível de infecção dos camundongos. Em camundongos geneticamente resistentes, tem sido observado que a ausência de expressão dos genes de IFN- $\gamma$  ou seu receptor, CD40 ou o ligando de CD40, aumenta a suscetibilidade à infecção. A interação de CD40 e seu ligando é necessária para a produção da do IFN- $\gamma$  da citocina necessário para orientar a resposta em direção a Th-1. Os camundongos com uma base genética resistente, que desenvolvem uma resposta do tipo Th-1, se tornam suscetíveis se eles forem deficientes na expressão da IL-12, desenvolvendo uma resposta do tipo Th-2. Dados recentes sugerem que a produção de IL-12 seja importante para orientar a resposta em direção a Th-1, e que a ausência de IL-4 pode evitar a resposta de Th-2.

Existe um grande número de proteínas de *Leishmania* que têm um caráter antigênico essencialmente caracterizado por processos de "Western-blot". No soro de pacientes e cães infectados por *Leishmania*, tem sido possível detectar a presença de anticorpos contra as proteínas da membrana, tais como a gp63, gp46, PSA e KPM-11. Adicionalmente, vários antígenos de localização intracelular citoplasmática têm sido caracterizados, tais como: Hsp70, Hsp83, LIP2a, LIP2b, LILIP0, H2A, H3 e uma proteína relacionada à cinesina, a K39 de *L. chagasi*. A reatividade dos anticorpos, que reconhecem as proteínas conservadas presentes no soro de cães infectados por *L. infantum*, é orientada em direção a áreas pouco conservadas destas proteínas. Algumas das proteínas de membranas são muito antigênicas em infecções naturais. Em todos os casos de infecção natural, existe uma grande restrição na resposta humoral contra as proteínas, porque os anticorpos desenvolvidos durante o processo infeccioso reconhecem muitas áreas restritas dele. Os níveis de IgG normalmente correspondem à

intensidade da infecção, refletem o grau e a duração do estímulo antigênico determinado pela carga parasitária. O antígeno de uma *Leishmania* homólogo aos receptores da cinase do tipo C (LACK) foi descrito recentemente, o qual produz uma resposta prematura do tipo Th-2. Em camundongos transgênicos quanto ao antígeno LACK e com uma formação genética suscetível à infecção, a indução de tolerância a este antígeno protege contra a infecção pela *Leishmania major*. Os anticorpos anti-*Leishmania* podem destruir os promastigotos *in vitro* na presença de complemento, promover a fagocitose e induzir a aderência de várias partículas à superfície dos promastigotos e amastigotos.

A reação patológica parece caminhar em paralelo com a densidade dos macrófagos parasitados. Na leishmaniose visceral, os macrófagos geralmente se distribuem de uma maneira difusa na totalidade dos diferentes tecidos orgânicos. O tipo de inflamação é constituído por um importante filtrado celular com uma predominância de linfócitos e células plasmáticas junto com hiperplasia das células fagocíticas. A inflamação produz alterações na fisiologia dos órgãos afetados, produzindo sérias alterações sistêmicas. Em algumas ocasiões, a inflamação granulomatosa local ocorre, com o aparecimento de granulomas e microgranulomas nos diferentes órgãos. Estes granulomas são constituídos por macrófagos e histiócitos (afetados ou não por parasitas) circundados por células plasmáticas e linfócitos e, em alguns casos, por fibroblastos. Este processo inflamatório é acompanhado por uma reação orgânica com a aparência de lesões características nos órgãos afetados. Alguns autores observaram depósitos de substância amilóide virtualmente na totalidade dos órgãos. Alguns autores formularam a hipótese de que os danos produzidos pela doença não são diretamente atribuíveis ao agente etiológico, mas à reação orgânica deflagrada.

#### VACINA CONTRA A LEISHMÂNIA

A imunidade intensa que segue a recuperação da leishmaniose cutânea tem dado um grande impulso ao desenvolvimento de vacinas profiláticas contra esta doença. Esta imunidade é derivada da indução de uma resposta T que tem associada a ela a produção de citocinas inflamatórias que ativam os macrófagos e destroem os parasitas. A memória imunológica nos casos de infecção é provavelmente mantida pela presença persistente do parasita no hospedeiro em um processo conhecido como imunidade concomitante.

Os primeiros estudos com respeito à vacinação contra a *Leishmania* na década dos anos 40 usaram parasitas vivos como imunógenos. Estes estudos conduziram à produção de vacinas que produziam proteção significativa contra a re-infecção subsequente. No entanto, o conhecimento da possibilidade de que organismos vivos poderiam produzir infecções reais fizeram com que tais programas de vacinação não tivessem lugar por muito tempo e, ao contrário, levaram ao interesse focalizado em vacinas com base em parasitas mortos. Estes estudos proporcionaram a primeira evidência sobre a possibilidade de produzir vacinas eficazes pela inoculação dos parasitas.

Os exames clínicos que usaram a imunização com promastigotos mortos da *Leishmania* também começaram na década dos anos 40. Estas vacinas tiveram notável sucesso já que um certo grau de proteção foi observado, que poderia oscilar entre 0 e 82%, dependendo da população. Estas vacinas tinham um efeito menor do que as vacinas de parasitas vivos. O isolamento de clones avirulentos de *L. major*, que protegem camundongos contra a infecção, também demonstrou que uma vacina atenuada é possível. Entretanto, a ignorância das mutações que conduzem à perda de virulência e ao risco de produção de revertantes virulentos torna este tipo de vacinação correntemente inaceitável.

Recentemente tem havido um importante progresso em

relação à identificação de vacinas candidatas molecularmente definidas, tais como gp63, gp46/M2, o antígeno de superfície relacionado ao último antígeno conhecido como PSA-2 e as proteínas dp72 e gp70-2, a proteína LACK e Kmp11. Especificamente, os epítomos T presentes na proteína gp63 foi identificado, resultando em que apenas alguns deles fossem capazes de induzir uma resposta T, tanto de Th-1 quanto de Th-2. Estes antígenos induzem proteção significativa em animais de modelo, quando eles são administrados com adjuvantes. A proteína PSA-2 de *Leishmania* é capaz de proteger contra a infecção por *L. major* mediante indução de uma resposta Th-1. Para avaliar o mecanismo de proteção desta proteína como uma vacina contra a *Leishmania* em seres humanos, sua capacidade para induzir proliferação da célula T foi estudada em pacientes que haviam sofrido de leishmaniose e se haviam recuperado dela. Foi observado que a proteína é capaz de produzir uma intensa proliferação das células T destes indivíduos, mas não dos controles sem qualquer história anterior de infecção. A resposta foi do tipo Th-1, tendo sido demonstrada pelo padrão de indução da citocina.

Vacinas subunitárias têm sido focalizadas intensamente nos antígenos, porque eles são fáceis de se identificar, isolar e clonar. No entanto, é necessário levar em conta que nem todas as moléculas da vacina potenciais têm se ser proteínas. De fato, o lipofosfoglicano (LPG) desempenha um papel essencial no estabelecimento da infecção. A vacinação com LPG pode proteger contra a infecção pela *L. major*. Apesar da existência de um dogma que estabelece que as células T não reconhecem antígenos não proteináceos, a molécula de LPG parece ser apresentada às células T pelas células de Langerhans da pele. Adicionalmente, existe a evidência que tem demonstrado que os glicolípídeos microbianos e outras moléculas não proteináceas possam reconhecer as células T quando elas são apresentadas através da via CD-1. Embora não existe nenhuma evidência clara de que a proteína KMP11 associada com LPG induza uma resposta protetora, foi

agora provado que a fração proteinácea associada a LPG é capaz de induzir uma resposta T e IFN- $\gamma$ , enquanto a fração LPG sem proteína não o é.

É normalmente aceito que as vacinas subunitárias, embora protetoras, apenas induzem uma imunidade de curto prazo. Este problema pode não ser importante em áreas endêmicas, onde os pacientes podem ser periodicamente reforçados por causa de infecções naturais. Um problema principal na utilização de subunidades pode surgir do fato de que pode não existir uma resposta a um antígeno único em uma população geneticamente diversa. Um coquetel de antígenos contendo indutores B e T pode superar este inconveniente. Foi recentemente publicado que um extrato de proteínas das membranas de *Leishmania infantum*, quando injetado por via intraperitoneal, é capaz de conferir proteção contra as formas virulentas dos promastigotos deste parasita, e que esta proteção é maior quando as proteínas são encapsuladas em lipossomas positivamente carregados. Adjuvanticidade e imunidade protetora eliciada por antígenos de *Leishmania donovani* encapsulados em lipossomas positivamente carregados.

A vacinação com ácidos nucleicos carregando genes que codificam as proteínas da *Leishmania* envolve a administração de material genético do parasita, ao hospedeiro. Este DNA é absorvido pelas células e é introduzido no núcleo, onde ele é transcrito e subsequentemente traduzido no citoplasma. A vantagem deste tipo de vacinação é ser possível direcionar a resposta imune por meio da via MHC-I ou MHC-II. Os antígenos produzidos intracelularmente são processados na célula e os peptídeos gerados são apresentados na superfície celular em associação com as moléculas MHC-I. A consequência deve ser que estas moléculas devem dar origem à indução de células T citotóxicas. Os antígenos produzidos em um ambiente extracelular devem ser especialmente absorvidos por células especializadas de apresentação a antígenos, processadas e apresentadas em sua superfície ligada às moléculas MHC-II, resultando na indução e ativação de células

CD4+ que secretam citocinas que regulam os mecanismos efetores de outras células do sistema imune.

O primeiro vetor de DNA a ser administrado como uma vacina continha o gene gp63. Igualmente, o gene PSA-2 foi introduzido em um plasmídeo e foi observado que ele gera uma resposta Th-1 e indução de proteção. A vacinação com os plasmídeos de DNA que contêm Ag-2 induz uma resposta Th-1 e protege contra a infecção com *L. major*, enquanto Ag-2 nos complexos imune estimulatórios elicia uma resposta Th-1 e Th-2 combinada e não protege, a despeito do fato que IFN- $\gamma$  é induzido. Igualmente, o gene que codifica a proteína LACK foi administrada por via subcutânea a camundongos BALB/c, em um vetor de expressão que expressa a proteína sob controle do promotor do citomegalovírus, e a proteção contra a infecção por *L. major* foi observada. Em quase todos os casos em que o DNA foi administrado, a via tem sido intramuscular, não obstante a injeção intradérmica de DNA particulado possa também ser explorada, já que ela requer uma quantidade menor de DNA. Outros sistemas de imunização usa vetores tais como *Salmonella*, BCG ou o vírus da *Vaccinia*. É interessante observar que a inclusão do gene gp63 no BCG é capaz de induzir proteção contra *L. major*.

O gene que codifica a proteína gp63 também foi introduzido no gene delta araC sob o controle do promotor rac em uma *Salmonella typhimurium* atenuada. A administração oral de  $1 \times 10^9$  colônias da bactéria transformada induz uma resposta T dentro do escopo tanto das células Th-1 quanto das células citotóxicas contra as células de mastocitomas que expressam gp63. A proteína gp63 na forma do complexo gp63-ISCOMs induz proteção em camundongos, evidenciada pela redução na inflamação e supressão das lesões. No soro, existem anticorpos do tipo IgG2a e, adicionalmente, é possível observar uma resposta Th-1 por indução de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10. Nenhuma resposta de DTH foi observada. A *Salmonella typhi*

*Nramp 1* transformada com gp63 elicia uma resposta Th-1 com indução de IL-2 e IFN- $\gamma$ , e uma forte resolução das lesões é detectada. Uma proteína de *L. pifanoi* conhecida como P-4 induz proteção significativa contra infecção por *Leishmania*. Estudos recentes em seres humanos com leishmaniose cutânea indicam que esta proteína ou os peptídeos dela derivados, são capazes de fazer as células T proliferarem. Não existe nenhuma indução de IL-4, enquanto o IFN- $\gamma$  é induzido. Os mutantes Aro-A e Aro-D de *Salmonella typhi* transformados com IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , administrados oralmente, podem ser vir como sistemas terapêuticos contra infecção por *L. major*. É interessante observar que, nestes pacientes, existe uma indução maior de iNOS. O gene gp63 foi também clonado em Aro-A e Aro-D, e tem sido observado que, após a administração oral, a proteína codificada é capaz de induzir proteção significativa contra a infecção por *L. major*. Esta mesma proteína é capaz de induzir proteção quando ela é administrada fundida a vários promotores em variedades específicas (GID105 e GID106) de *Salmonella*.

Uma proteína artificial denominada Q foi recentemente descrita por nosso grupo, a qual é composta de vários fragmentos antigênicos de 4 proteínas de *Leishmania infantum* (mais especificamente, Lip2a, Lip2b, P0 e H2A), que, após ter sido usada como antígeno, provou um importante valor para o diagnóstico da leishmaniose canina, com uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 100% em comparação com os soros de animais de controle que não haviam sido infectados. Igualmente nosso grupo demonstrou que a proteína hsp70 de *Leishmania infantum* é um importante alvo da resposta imune em infecções causadas pela infestação com este parasita.

Com o objetivo de explorar a possibilidade de que a proteína Q possa ser usada para projetar sistemas de proteção contra a infecção por *Leishmania infantum*, tanto em si quanto em combinação com Hsp70, três

séries de experiências foram planejadas usando-se o hamster como um modelo. Uma experiência foi planejada para verificar se a imunização com a Proteína Q protegia os animais contra a infecção a curto prazo, outra para verificar se a imunização os protegia a longo prazo e a terceira foi para verificar este efeito protetor após a imunização com as duas proteínas juntas. Foi, após isso, observado tanto da análise a curto prazo quanto da análise a longo prazo, que a proteína Q era capaz de eliciar uma resposta imune que reduzisse a carga parasítica tanto no fígado quanto no baço, após a infecção por *Leishmania infantum* na maior parte dos animais infectados, e que a imunização com as proteínas Q+Hsp70 também induziam uma resposta significativa contra ambas as proteínas e levavam a uma redução significativa da carga parasítica na maioria dos animais imunizados.

#### EXEMPLO 1: IMUNIZAÇÃO COM A PROTEÍNA Q

4 animais foram imunizados com 5 microgramas de proteína Q dissolvidos em 40 microlitros de adjuvante de Freund, e outros 4 animais foram imunizados com a mesma quantidade de adjuvante emulsificado com 40 microlitros de solução salina PBS sem a proteína. Na primeira imunização foi empregado adjuvante completo de Freund combinado com a proteína, enquanto nas duas imunizações subseqüentes, o adjuvante incompleto de Freund foi usado misturado com a proteína na mesma proporção de proteína/adjuvante. Três imunizações intraperitoneais foram realizadas em intervalos de 15 dias. Começando-se da segunda semana após cada imunização e durante o período completo de imunização, amostras de sangue foram extraídas para medir a resposta humoral em relação à proteína Q nos ensaios ELISA. Foi observado que já na segunda semana após a primeira imunização, existia uma resposta IgG positiva em relação à proteína Q, e que esta resposta era elevada após a segunda semana depois da infecção, e aumentava com o tempo de imunização, alcançando os títulos de 1/100.000. Igualmente, foi observado que a resposta imune em relação à proteína Q não

era modificada significativamente após a infecção com o parasita da Tabela 4.

Quinze dias após a terceira imunização, os animais foram infectados com uma dose de  $10^5$  parasitas promastigotos, diferenciados dos amastigotos infecciosos originários de um hamster infectado. Foi previamente verificado que o inóculo era capaz de induzir uma forte parasitemia junto com a doença quatro meses após ter-se administrado os parasitas, em 100% dos animais infetados. A Tabela 1 indica o nível de parasitemia por mg de tecido, tanto no fígado quanto no baço, dos animais de controle e dos vacinados. É possível observar que, em todos os animais vacinados, a carga parasítica no fígado decresce em relação aos controles, e que isto acontece de uma maneira muito significativa em 75% deles. Quando a carga parasítica no baço é examinada, é possível observar que também em 75% dos animais esta carga foi significativamente menor do que aquela dos controles, a RPL alcançando os 83% a 86%. O animal em que a RPL foi de 20% no fígado, teve uma RPL de 48% no baço.

**TABELA 1.** Carga parasítica no fígado e no baço de hamsters vacinados com a proteína Q através da via intraperitoneal. Após quatro semanas da infecção, a carga parasítica foi medida pelo processo de diluições limites (curto prazo).

A carga parasítica é expressa como parasitas por miligrama de tecido. RPL = redução na carga parasítica em %.

#### HAMSTER IMUNIZADO COM A PROTEÍNA Q

| Hamster | Fígado     | (RPL) | Baço         | (RPL) |
|---------|------------|-------|--------------|-------|
| 1       | $4 \pm 1$  | (71%) | $49 \pm 3$   | (83%) |
| 2       | $3 \pm 2$  | (78%) | $39 \pm 2$   | (86%) |
| 3       | $5 \pm 1$  | (64%) | $50 \pm 4$   | (83%) |
| 4       | $11 \pm 3$ | (20%) | $153 \pm 19$ | (48%) |

Os números representam a média de três determinações.

#### Controles

4 hamsters  $14 \pm 5$        $295 \pm 30$

O número representa a média dos 4 animais.

### EXEMPLO 2

De modo a verificar o efeito da vacinação com a proteína Q na redução da carga parasítica em longo prazo, usando-se outra via de inoculação, 4 animais receberam por injeção subcutânea 5 microgramas de proteína Q dissolvida em 40 microlitros de PBS e misturados com 40 microlitros de adjuvante de Freund. Na primeira imunização, o adjuvante completo de Freund foi empregado, enquanto nas duas subseqüentes, foi utilizado adjuvante incompleto de Freund, como indicado acima. A vacinação foi administrada em três doses espaçadas em intervalos de 15 dias. Quinze dias após a terceira imunização, foi-lhes administrado um inóculo de  $10^5$  parasitas infecciosos. Durante todo o período de imunização e durante toda a infecção (cinco meses), foi extraído sangue para se determinar a espécie de resposta humoral em relação à proteína Q e em relação às proteínas totais dos parasitas. A Tabela 5 mostra que já após a segunda semana de imunização, a resposta em relação à proteína Q foi positiva, como no caso anterior, em três dos camundongos, e que a resposta em relação à proteína foi muito elevada após duas semanas da primeira imunização. A resposta mantida em muito elevada após as imunizações remanescentes, alcançou um título de 1/75.000 na semana seguinte à terceira imunização. Em um dos animais, a resposta em relação à proteína Q foi mais lenta em relação a tempo, embora a resposta tivesse alcançado o nível daquela nos outros animais pelo final da experiência. Conseqüentemente, a partir dos dados derivados tanto do Exemplo 1 quando do Exemplo 2, é possível concluir que o grau da resposta imune em relação à proteína, por ambas as vias, intraperitoneal e subcutânea, é muito rápido, não obstante a resposta através da via intraperitoneal tivesse alcançado títulos mais elevados nos mesmos tempos (1/75.000 versus 1/30.000). A Tabela 6 indica a resposta em relação à proteína Q nos animais de controle. É possível observar que a reatividade em relação a esta proteína

é detectada nas 12<sup>a</sup> às 14<sup>a</sup> semanas após a infecção, que é quando os primeiros sintomas atribuíveis a uma leishmaniose potencial começam a ser detectados nos animais infectados. A Tabela 2 mostra os níveis de parasitemia no fígado e no baço dos animais de controle e vacinados. Pode ser observado que 50% dos animais foram protegidos no nível do fígado, no sentido em que a redução no nível de parasitemia tenha sido muito elevada (87 a 89%). Um dos animais não foi protegido, enquanto em outros dos animais a redução da carga parasítica foi de 22%. Ao contrário, a redução da carga parasítica foi de 98 a 99% em 100% dos animais ao nível do baço.

**TABELA 2.** Carga parasítica no fígado e no baço de hamsters vacinados com a proteína Q através da via subcutânea. Após 20 semanas da infecção, a carga parasítica foi medida pelo processo de diluições limites (longo prazo). A carga parasítica é expressa como parasitas por miligrama de tecido. RPL = redução na carga parasítica em %.

HAMSTERS IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA Q

| Hamster | Fígado            | (RPL) | Baço              | (RPL)   |
|---------|-------------------|-------|-------------------|---------|
| 1       | $1,4 \times 10^6$ | (22%) | $1,0 \times 10^7$ | (98%)   |
| 2       | $2,0 \times 10^5$ | (89%) | $4,9 \times 10^5$ | (99,9%) |
| 3       | $2,4 \times 10^5$ | (87%) | $3,3 \times 10^5$ | (99,9%) |
| 4       | $2,4 \times 10^6$ | (0%)  | $6,3 \times 10^5$ | (99,9%) |

Os números representam a média de três determinações.

Controles

4 hamsters  $1,8 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^5$      $5,2 \times 10^8 \pm 2,6 \times 10^7$

Os números representam a média da carga parasítica dos 4 animais.

Com o objetivo de testar se a proteína Q poderia ser usada para projetar sistemas de proteção em formulações que contivessem a proteína LiHsp70 de *Leishmania infantum*, uma experiência foi realizada em camundongos Balb/c. Observou-se que, após a imunização, a carga parasítica, tanto no fígado quanto no baço, havia sido significativamente

reduzida, sendo, em alguns dos animais, de quatro ordens de grandeza inferior.

**EXEMPLO 3: IMUNIZAÇÃO COM A PROTEÍNA Q + A PROTEÍNA Hsp70 EM ADJUVANTE DE FREUND.**

5 Cada um dos 4 hamsters recebeu por injeção intraperitoneal 5 microgramas de proteína Q e 5 microgramas de proteína LiHsp70 dissolvidos em 40 microlitros de PBS e emulsificados em 40 microlitros de adjuvante de Freund. Na primeira imunização, o adjuvante completo de Freund foi empregado, enquanto nas duas subseqüentes, o adjuvante incompleto de Freund foi usado como indicado acima. A vacinação foi administrada em três doses espaçadas em intervalos de 15 dias.

10 Quinze dias após a terceira imunização, administrou-se-lhes um inóculo de  $10^6$  parasitas infecciosos através da via intracardíaca, e foram sacrificados na semana 22. A cada duas semanas, para todo o período de imunização e durante toda a infecção, extraiu-se sangue deles para determinar o grau de resposta humoral em relação à proteína Q e em relação à proteína LiHsp70.

15 A carga parasítica relativa entre os camundongos imunizados com a proteína Q mais LiHsp70 é mostrada na Tabela 3. Foi observado que todos os animais foram altamente protegidos e, em alguns deles, no baço, a redução chegou perto de duas a três ordens de grandeza.

20 **TABELA 3. CARGA PARASÍTICA RELATIVA DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA Q MAIS LiHsp70 APÓS 4 MESES DE INFECÇÃO**

## CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA Q E LiHsp70

| Camundongo | Fígado (RPL)            | Baço (RPL)              |
|------------|-------------------------|-------------------------|
| 1          | $1,5 \times 10^3$ (97%) | $1,5 \times 10^4$ (99%) |
| 2          | $0,9 \times 10^3$ (98%) | $1,4 \times 10^3$ (99%) |
| 3          | $2,0 \times 10^4$ (60%) | $5,6 \times 10^4$ (99%) |
| 4          | $0,8 \times 10^4$ (84%) | $1,2 \times 10^5$ (96%) |

Os números representam a média de três determinações.

## Controles

4 camundongos  $5,1 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$ ,  $3,2 \times 10^6 \pm 8 \times 10^4$

Os números representam a média da carga parasítica dos 4 animais.

5 As Tabelas 4 e 5 mostram que todos os animais dos Exemplos 1 e 2 respondem imunologicamente à proteína Q, e que, partindo-se da segunda semana após a imunização, a resposta em relação à proteína Q foi alta e esta resposta aumentada após a segunda imunização (semana 4). A Tabela 6 mostra que a resposta em relação à proteína LiHsp70, durante todo o tempo da experiência, também foi positiva, embora inferior à resposta do Exemplo 3 em relação à proteína Q.

10 **TABELAS 4 e 5.** Mostram a resposta imune em 4 hamsters que receberam a injeção intraperitoneal com 5 microgramas de proteína Q (Tabela 4 - Exemplo 1, curto prazo) e a resposta imune em 4 hamsters que receberam a injeção subcutânea com 5 microgramas de proteína Q (Tabela 5 - Exemplo 2, longo prazo).

**TABELA 4: EXEMPLO 1, CURTO PRAZO**

Camundongos imunizados com a proteína Q (curto prazo)

Resposta imune em relação à proteína Q

| Semana    | Camundongo 1 | Camundongo 2 | Camundongo 3 | Camundongo 4 |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2         | 0,8          | 0,2          | 0,3          | 0,6          |
| 4         | 1,9          | 2,3          | 1,1          | 2,1          |
| 6         | 3            | 3            | 2,4          | 2,9          |
| Infectado |              |              |              |              |
| 8         | 3            | 3            | 2,9          | 3            |
| 10        | 3            | 3            | 3            | 3            |

Os soros (diluídos a 1/200) que apresentam uma densidade ótica de 3 têm um título mais elevado do que 1/45.000

#### Camundongos de controle -

| Semana | Camundongo 1 | Camundongo 2 | Camundongo 3 | Camundongo 4 |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 4      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 6      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 8      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 10     | 0            | 0            | 0            | 0            |

Os soros foram diluídos a 1/200.

#### 5 TABELA 5: EXEMPLO 2, LONGO PRAZO

##### RESPOSTA IMUNE EM RELAÇÃO À PROTEÍNA Q

| Semana | Camundongo 1 | Camundongo 2 | Camundongo 3 | Camundongo 4 |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2      | 1,8          | 1,3          | 1,9          | 0,4          |
| 4      | 2,1          | 1,8          | 2,2          | 0,7          |
| 6      | 2,5          | 2,7          | 2,5          | 0,5          |
| 8      | 2,8          | 2,2          | 2,2          | 0,8          |
| 10     | 3            | 2,9          | 2,5          | 0,7          |
| 12     | 3            | 3            | 3            | 0,9          |
| 14     | 3            | 3            | 3            | 1            |
| 16     | 3            | 3            | 2,9          | 1,5          |
| 18     | 3            | 3            | 3            | 1,7          |
| 20     | 3            | 3            | 3            | 2,2          |
| 22     | 3            | 3            | 3            | 2,6          |
| 24     | 3            | 3            | 3            | 3            |
| 26     | 3            | 3            | 3            | 3            |

Os soros (diluídos a 1/200) que apresentam uma densidade ótica de 3 têm um título mais elevado do que 1/45.000

#### Camundongos de controle

#### 10 Resposta imune contra proteína Q (a longo prazo)

| Semana | Camundongo 1 | Camundongo 2 | Camundongo 3 | Camundongo 4 |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 4      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 6      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 8      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 10     | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 12     | 0,2          | 0,1          | 0,3          | 0,1          |
| 14     | 0,3          | 0,5          | 0,4          | 0,2          |
| 16     | 0,4          | 0,5          | 0,7          | 0,3          |
| 18     | 0,9          | 1,1          | 1,7          | 0,6          |
| 20     | 1,1          | 1,3          | 1,5          | 0,8          |
| 22     | 2,5          | 2,3          | 2,7          | 1,9          |
| 24     | 2,3          | 2,1          | 1,8          | 2,2          |
| 26     | 1,9          | 2,2          | 2,3          | 2,7          |

Os soros foram diluídos a 1/200.

**TABELA 6.** Mostram a resposta imune em 4 hamsters que receberam a injeção intraperitoneal com 5 microgramas de proteína Q mais 5 microgramas de proteína LiHSP 70 (Exemplo 3, longo prazo).

5 Camundongos imunizados com a proteína Q + Hsp70

Resposta imune em relação à proteína Q

| Semana | Camundongo 1 | Camundongo 2 | Camundongo 3 | Camundongo 4 |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2      | 0,4          | 0,6          | 0,5          | 0,4          |
| 4      | 1,6          | 1,1          | 1,6          | 1,7          |
| 6      | 3            | 2            | 1,9          | 1,9          |
| 8      | 3            | 2,4          | 2,6          | 2,5          |
| 10     | 3            | 2,9          | 3            | 2,9          |
| 12     | 2,7          | 2,9          | 2,9          | 2,9          |
| 14     | 2,5          | 2,6          | 2,9          | 2,7          |
| 16     | 2,6          | 2,5          | 2,5          | 2,4          |
| 18     | 2,8          | 2,7          | 2,7          | 2,5          |
| 20     | 2,5          | 2,8          | 2,4          | 2,7          |
| 22     | 2,5          | 2,3          | 2,8          | 2,9          |

Os soros foram diluídos a 1/200.

**Camundongos de controle**

## Resposta imune contra a proteína Q

| Semana | Camundongo 1 | Camundongo 2 | Camundongo 3 | Camundongo 4 |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 4      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 6      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 8      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 10     | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 12     | 0            | 0,1          | 0,2          | 0,1          |
| 14     | 0,3          | 0,4          | 0,2          | 0,5          |
| 16     | 0,5          | 0,6          | 0,7          | 0,7          |
| 18     | 0,8          | 1,4          | 1,1          | 1,5          |
| 20     | 1,8          | 1,6          | 1,8          | 2,2          |

O soro foi diluído 1/200.

Camundongos foram imunizados com a proteína Q + Hsp70

## Resposta imune contra a proteína Hsp70

| Semana | Camundongo 1 | Camundongo 2 | Camundongo 3 | Camundongo 4 |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2      | 0,1          | 0,2          | 0,1          | 0,4          |
| 4      | 0,4          | 0,6          | 0,3          | 0,5          |
| 6      | 0,8          | 0,7          | 0,4          | 0,3          |
| 8      | 0,7          | 1,1          | 1,2          | 0,5          |
| 10     | 1,2          | 1,4          | 1,5          | 0,8          |
| 12     | 1,9          | 1,9          | 2            | 1,2          |
| 14     | 2            | 1,8          | 2,2          | 1,7          |
| 16     | 1,9          | 2            | 2,2          | 1,9          |
| 18     | 2            | 2,1          | 2            | 2            |
| 20     | 2            | 2,1          | 2,2          | 1,9          |
| 22     | 2,4          | 2,3          | 2,1          | 1,9          |

5 Os soros foram diluídos 1/800

## Camundongos de controle

## Resposta imune contra a proteína Hsp70

| Semana | Camundongo 1 | Camundongo 2 | Camundongo 3 | Camundongo 4 |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 4      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 6      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 8      | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 10     | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 12     | 0,1          | 0            | 0,3          | 0            |
| 14     | 0,3          | 0,2          | 0,5          | 0,4          |
| 16     | 0,5          | 0,6          | 0,6          | 0,3          |
| 18     | 0,7          | 0,6          | 0,7          | 0,5          |
| 20     | 1            | 0,8          | 0,5          | 1,2          |
| 22     | 1,7          | 1,4          | 0,8          | 1,1          |

Os soros foram diluídos 1/200

EXEMPLO 4: IMUNIZAÇÃO COM PROTEÍNA Q + BCG EM

## CAMUNDONGOS BALB/c

Quatro camundongos Balb/c receberam, cada um, a injeção intraperitoneal com 5 microgramas de proteína Q e  $10^6$  Unidades Formadoras de Colônia (CFU) de BCG (bacilo Calmette-Guérin) dissolvidos em 40 microlitros de PBS. A imunização foi efetuada em três doses, 15 dias de intervalo. 15 dias após a terceira imunização, eles receberam um inóculo de parasitas infecciosos de  $10^5$  BCN150 de *L. infantum* pela via intracardíaca. A cada duas semanas, por todo o tempo de imunização e na totalidade da infecção, amostras de sangue foram tomadas deles para testar o grau de resposta humoral à proteína Q. Os animais foram sacrificados na semana 8 após a infecção.

A Tabela 7 (a e b) mostra que os animais imunizados respondem positivamente à proteína Q, começando da segunda semana, e que a resposta aumenta progressivamente até, em muitos casos, que ela alcance valores de 400.000.

A Tabela 8 mostra a diferença na carga parasítica entre o fígado e o baço dos animais vacinados e de controle.

**TABELA 7:** Resposta imune à proteína Q em camundongos Balb/c imunizados com 5 microgramas de proteína Q e  $10^6$  CFU de BCG

Camundongos 1, 2, 3, 4 imunizados

Camundongos 5, 6, 7, 8 controles não imunizados

**TABELA 7: REAÇÃO À PROTEÍNA Q**

| Semana        | Camundongo 1 | Camundongo 2 | Camundongo 3 | Camundongo 4 |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| pré-imune     | 0            | 0            | 0            | 0            |
| 1ª imunização |              |              |              |              |
| 1             | 0            | 0,2          | 0,1          | 0            |
| 2ª imunização |              |              |              |              |
| 3             | 0,5          | 0,7          | 0,8          | 0,9          |
| 3a imunização |              |              |              |              |
| 6             | 1,6          | 2,1          | 2,6          | 2,7          |
| 7             | 1,8          | 2,3          | 2,4          | 2,1          |
| 9             | 2,1          | 2,6          | 2,5          | 1,9          |
| 11            | 2,7          | 2,9          | 3            | 3            |
| 13            | 3            | 3            | 3            | 3            |
| Semana        | Camundongo 5 | Camundongo 6 | Camundongo 7 | Camundongo 8 |
| pré-imune     | 0            | 0            | 0            | 0            |

|               |    |   |   |   |   |
|---------------|----|---|---|---|---|
| 1ª imunização | 1  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2ª imunização | 3  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3ª imunização | 6  | 0 | 0 | 0 | 0 |
|               | 7  | 0 | 0 | 0 | 0 |
|               | 9  | 0 | 0 | 0 | 0 |
|               | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|               | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |

o número 3 é equivalente a superabundância no sistema de medição.

os soros foram tomados no início de cada uma das semanas indicadas

a primeira imunização foi efetuada no dia 0, a segunda, no dia 15, e a terceira, no dia 30.

- 5 **TABELA 8.** Carga parasítica no fígado e no baço de camundongos Balb/c vacinados com a proteína Q subcutaneamente +  $10^6$  de BCG. 8 semanas após a infecção a carga parasítica foi medida por microscopia ótica das impressões dos do tecido pela medição de diferentes campos contendo 7000 células nucleadas. A carga parasítica é representada como a quantidade de parasitas por miligrama de tecido, tendo sido anteriormente calculado que 1 parasita por 1000 células nucleadas é equivalente a uma quantidade aproximada de 210 parasitas por miligrama de tecido.

RPB = redução da carga parasítica, %.

| Camundongo | Fígado | (RPB)  | Baço | (RPB)  |
|------------|--------|--------|------|--------|
| 1          | 72     | (82%)  | 457  | (89%)  |
| 2          | 40     | (90%)  | 207  | (95%)  |
| 3          | 48     | (88%)  | n.d. | (100%) |
| 4          | n.d.   | (100%) | 90   | (98%)  |

Controles

- 15 4 animais. Média 400 ± 15 4155 ± 30

n.d. parasitas que não puderam ser detectados em 5000 células nucleadas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de ser para a prevenção de Leishmaniose em humanos e animais, compreendendo um polinucleotídeo consistindo da sequência de nucleotídeos da SEQ ID No.: 2, e  
5 um adjuvante fisiológico apropriado para administração intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda uma proteína LiHsp70, completa ou fragmentada, ou variantes da mesma.

10 3. Proteína, caracterizada pelo fato de que consiste da sequência de aminoácidos da SEQ ID No.: 1.

4. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que consiste da sequência de nucleotídeo da SEQ ID No.: 2.

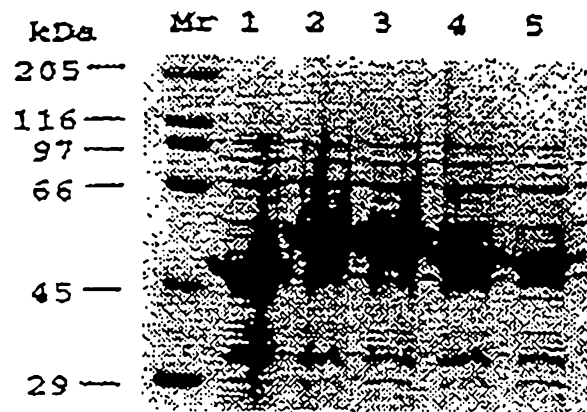
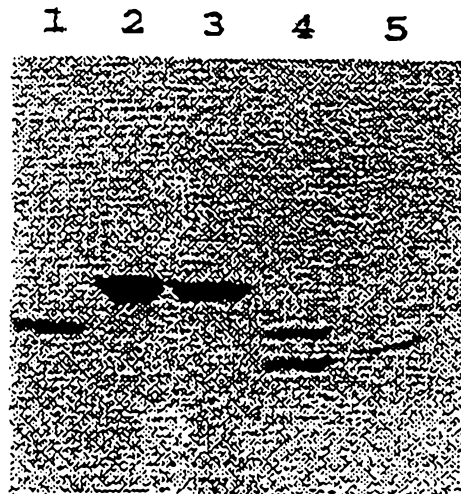
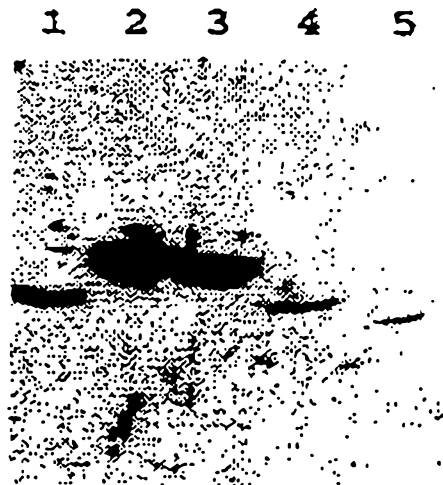
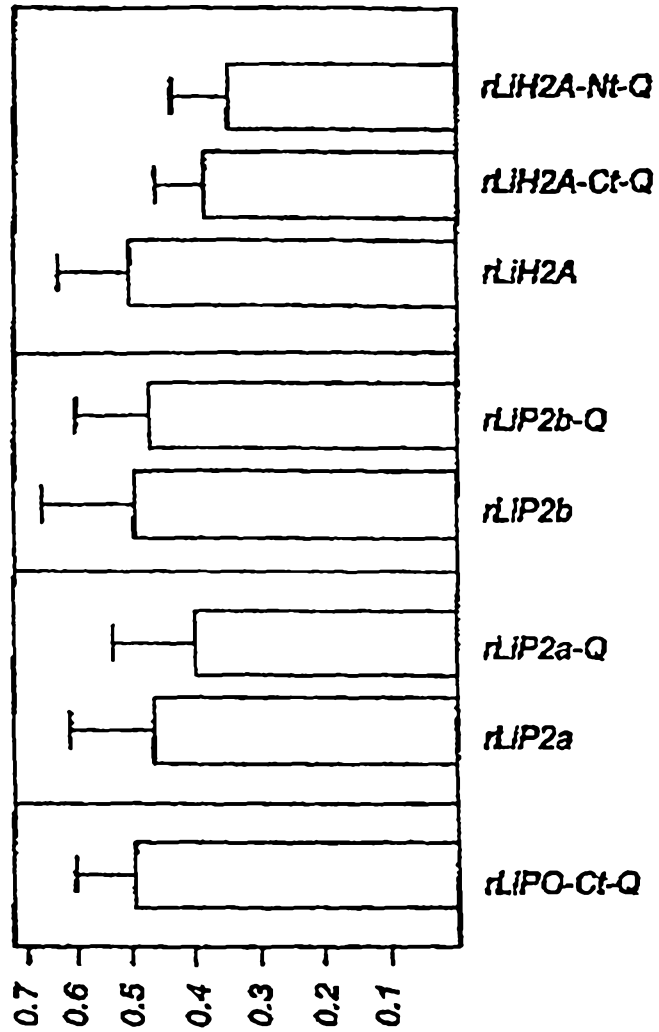
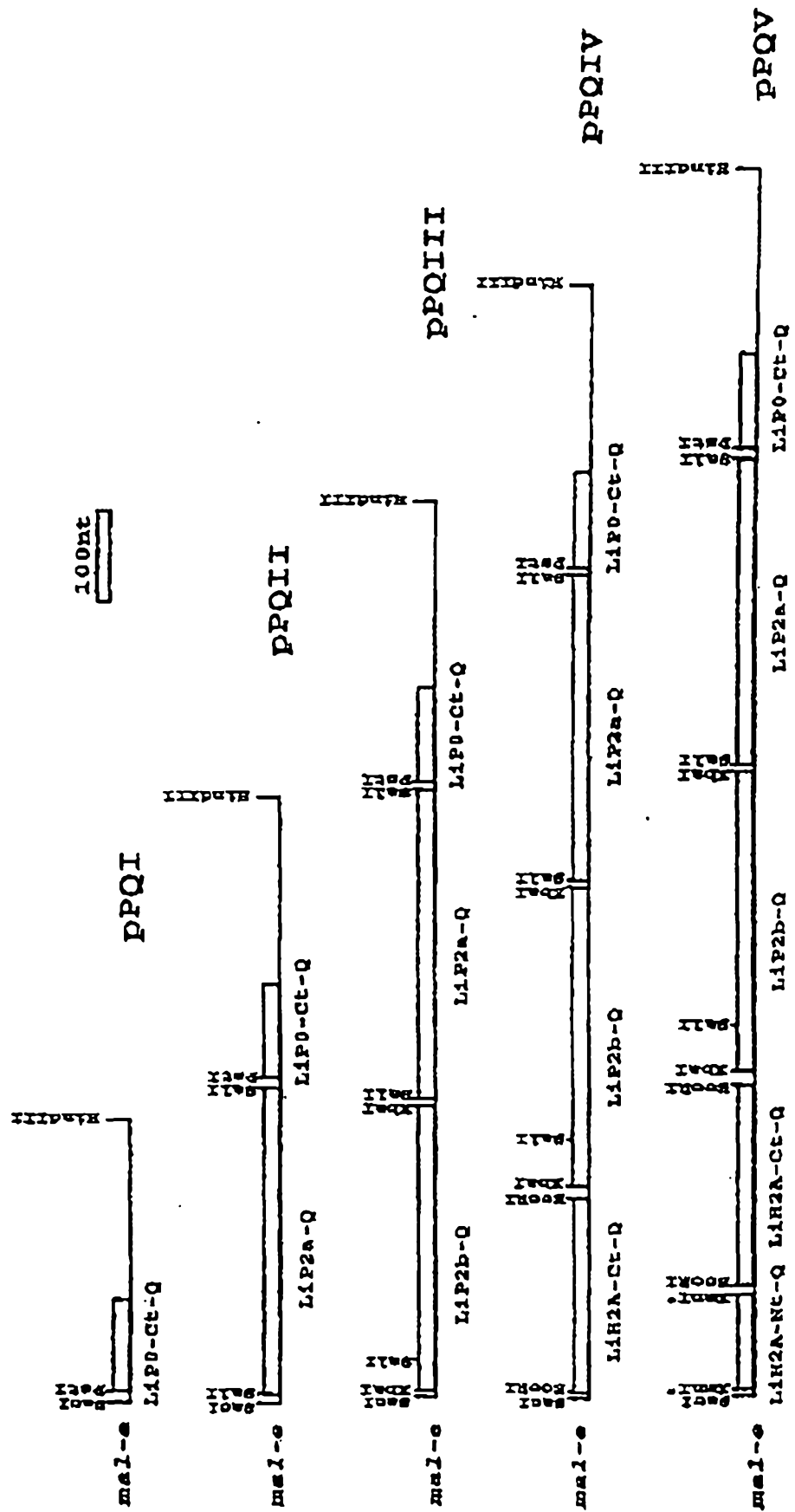
*Fig 1a**Fig 1b**Fig 1c*

Fig 1d

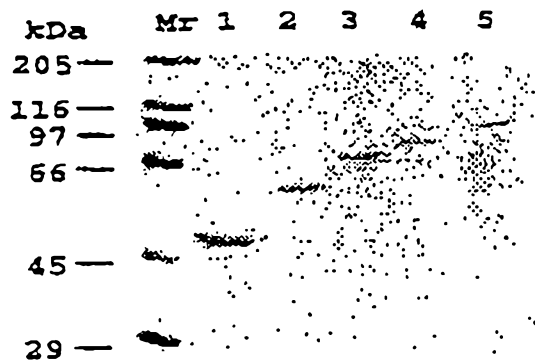
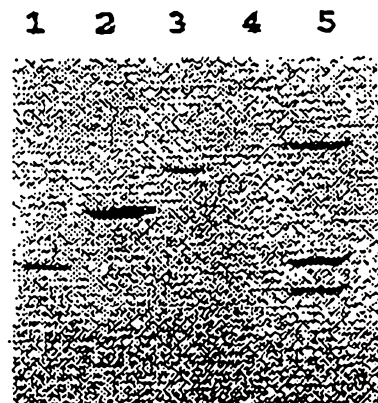


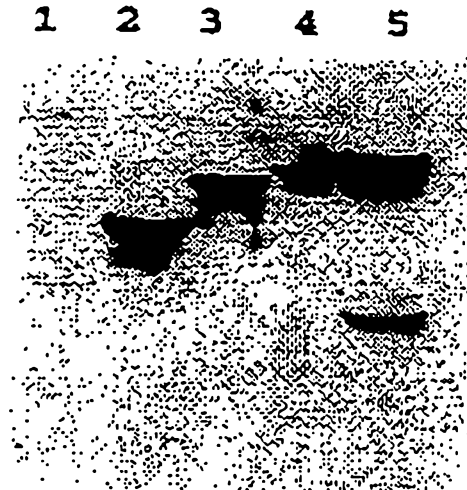
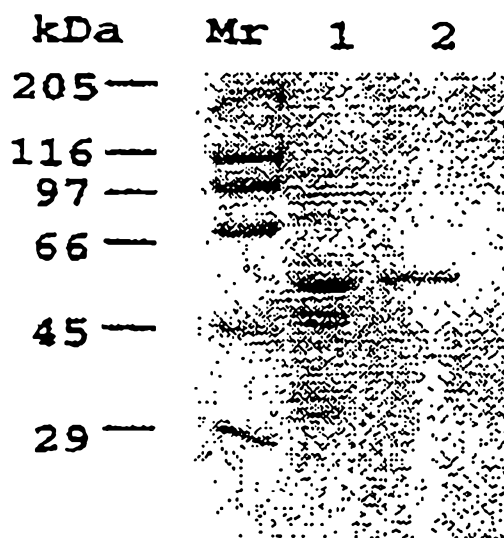
10021

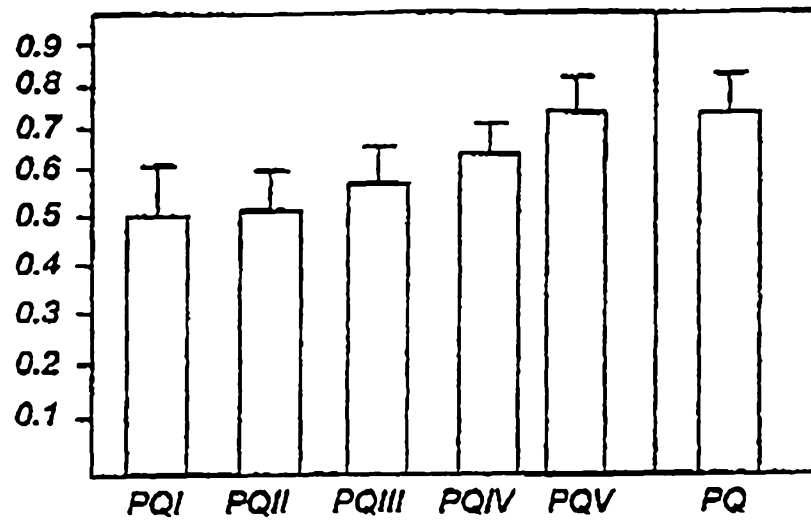


*Fig 3*

**MBP** IEGRPITPRSAKKAVRKSGSKSAKCGLI~~FPVGRVGGMMRRGQYARRIGA~~ 50  
 SGAPRISEFSVKAAAQSGKKRCRLNPRTVM~~LAA~~RHDDDIGTLLKNVTLSHSGVV 104  
 PNISKAMAKKKGGKKGKATPSAPEFGDSSRPMSTKYLAAYALASLSKASPSQAD 157  
 VEAICKAVHIDVDQATLAFVMESVTGRDVATLIAEGAAKMSAMPAASSSGAAAGV 211  
 TASAAGDAAPAAAAAKKDEFEEEADDDMGPSVRDPNQYLAAYALVALSGKTPSK 265  
 ADVQAVLKAAGVAVDASRVDAVFQEVEGQSFDALVAEGRTKLVGSGSAPAGAV 319  
 STAGAGAGAVAEAKKEEPEEEEEADDDMGEVDLOPAAPAAAPSAAAKAAPPEESD 374  
 EDDFGMGGLF

*Fig 4a**Fig 4b*

*Fig 4c**Fig 4d**Fig 4e*

*Fig 4f**Fig 5*