

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 149**

21 Número de solicitud: 202030547

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/30 (2006.01)

A61K 39/008 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

08.06.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.11.2020

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

26.07.2021

Fecha de concesión:

27.06.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

04.07.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)**

**Avda. de Séneca, 2
28040 MADRID (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ RODRIGO, Abel;
MAS ZUBIRI, Alicia;
CARRIÓN HERRERO, Francisco Javier;
ORDEN GUTIÉRREZ, José Antonio;
DE LA FUENTE LÓPEZ, Ricardo y
DOMÍNGUEZ BERNAL, Gustavo**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **QUIMERA SINTÉTICA MULTIEPITÓPICA COMO VACUNA Y TRATAMIENTO FRENTE A LEISHMANIOSIS EN MAMÍFEROS**

57 Resumen:

Quimera sintética multiepitópica como vacuna y tratamiento frente a leishmaniosis en mamíferos.

La invención se refiere a quimeras sintéticas que incluyen 4 péptidos multiepitópicos frente a Leishmania. Cada uno de los péptidos se ha seleccionado de una proteína de Leishmania infantum. Se trata de las histonas nucleosomales H2A, H2B, H3 y H4. La invención también se refiere a una composición farmacéutica que incluye una de estas quimeras sintéticas. También se refiere a una vacuna profiláctica y/o terapéutica frente a Leishmania spp para su uso en mamíferos y, especialmente, en humana y en perros.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 795 149 B2

DESCRIPCIÓN

Quimera sintética multiepitópica como vacuna y tratamiento frente a leishmaniosis en mamíferos

5

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector de la sanidad humana y animal. De forma más concreta, la invención se refiere a una quimera sintética multiepitópica y su uso en la elaboración de una vacuna y un tratamiento inmunoterapéutico frente a la infección por *Leishmania spp.*

10

Antecedentes de la invención

Las leishmaniosis constituyen un grupo de enfermedades con distribución mundial y están causadas por parásitos protozoos intracelulares del género *Leishmania*, que son transmitidos por un insecto vector conocido como flebótomo. Esta enfermedad presenta cuadros clínicos y epidemiológicos diversos. Según datos procedentes de la OMS, la prevalencia de la enfermedad es de 12 millones de casos y actualmente amenaza a 350 millones de personas en 88 países diferentes, principalmente en países en vías de desarrollo (Sudán, India, Bangladesh, Nepal y Brasil) de zonas tropicales y subtropicales, aunque también tiene importancia en la cuenca mediterránea.

15

20

Atendiendo a los síntomas clínicos de la enfermedad, las leishmaniosis se han clasificado en varios tipos. Por un lado, la leishmaniosis visceral (LV) y, por otro, el resto de leishmaniosis con manifestaciones cutáneas: leishmaniosis cutánea (LC), cutáneo-difusa (LCD) y muco-cutánea (LMC). *Leishmania infantum* es el principal agente causal de la LV en la región Mediterránea donde, además, el perro doméstico está considerado como el principal reservorio, jugando un papel clave en la aparición de la enfermedad en los seres humanos. Por otro lado, *L. major* es una de las especies con mayor repercusión en la LC en el Viejo Mundo.

25

30

A pesar de tener una larga historia, la leishmaniosis continúa siendo la cuarta causa más común de muerte y enfermedad, respectivamente, entre las enfermedades tropicales. Además, recientemente se han publicado varios estudios sobre la leishmaniosis que muestran cómo los parásitos se están propagando a nuevas zonas geográficas de todo el mundo adaptándose a entornos cambiantes.

35

En este contexto, la inmunización parece ser el mejor enfoque para controlar la leishmaniosis, ya que los tratamientos actuales son altamente tóxicos y muy costosos, de larga duración. A esto se le suma la posible aparición de resistencias. Curiosamente, mientras que una infección por este parásito genera inmunidad, una inmunización exitosa frente a *Leishmania spp.* dependerá de la generación de linfocitos T de memoria específicas que puedan mantenerse a lo largo del tiempo. Una vacuna eficaz también debe inducir el desarrollo de una inmunidad antiparasitaria mediada por células CD8+ y CD4+ Th1, que se caracteriza por la producción de interferón- γ (IFN- γ) y de IL-12 entre otras citoquinas proinflamatorias.

40

45

A pesar de las extensas investigaciones para el avance hacia el desarrollo de vacunas y la mayor comprensión de la inmunopatogénesis de la leishmaniosis visceral (VL), no existe ninguna vacuna autorizada para la inmunopprofilaxis o la inmunoterapia contra la VL humana. Sí hay tres vacunas disponibles en el mercado para la inmunización contra la leishmaniosis canina (LeishTec®, CaniLeish® y LetiFend®) y, hasta 2014, hubo otra más que, actualmente, está retirada (Leishmune®).

50

En WO2006122382A1 se describe la vacuna que se comercializó en Brasil con el nombre de Leishmune® y que, posteriormente, fue retirada debido a que, en los ensayos de la fase III, no se pudo demostrar su eficacia. Se trata de una vacuna de segunda generación, compuesta por el ligando de fucosa-manosa (FML) de *L. donovani* y la saponina como adyuvante.

LeishTec® es la vacuna actualmente autorizada en Brasil para perros. Comprende una proteína recombinante de amastigotes de *L. donovani* (proteína A2) y saponina como adyuvante. Son varias las patentes y solicitudes de patente que proponen a A2 como proteína de elección para la elaboración de vacunas frente a *Leishmania*: WO2009089605A1, WO2002078735A2, US5733778, WO2019160971A1, entre ellas.

En Europa se comercializa CaniLeish® desde 2011, compuesta por antígenos secretados y excretados de promastigotes de *L. infantum*, también con saponina como adyuvante. En ES2595207T3, se describe un complejo vacunal terapéutico para la prevención o el tratamiento de la leishmaniosis que está compuesto por moléculas de excreción y secreción procedentes de amastigotes y/o de promastigotes de *Leishmania spp.* producidas en un medio definido.

La cuarta de las vacunas citadas es LetiFend®. Se trata de una vacuna recombinante que contiene una proteína quimérica (proteína Q) formada por cinco fragmentos antigénicos de cuatro proteínas diferentes de *L. infantum* (las proteínas ribosomales LiP2a, LiP2b y LiP0 y la histona H2A), descrita en ES2133236B1 y en ES2326174T3.

Sin embargo, después de varios años de comercialización, siguen existiendo dudas sobre la eficacia y la efectividad de estas vacunas, la infecciosidad potencial de los animales vacunados e infectados o la interferencia de los anticuerpos inducidos por la vacuna en el diagnóstico serológico de *L. infantum* (Velez, R.; Gallego, M. *Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. Trop Med Int Health.* (2020) 25, 5:540–557.) de manera que el método más utilizado para prevenir la enfermedad en los perros que viven en zonas endémicas sigue siendo la aplicación tópica de tratamientos con repelentes e insecticidas. Sin embargo, incluso cuando se utilizan correctamente, estos productos no pueden proteger completamente a los perros y es imprescindible adoptar más medidas de control. En este sentido, se han descrito otras posibles vacunas buscando una solución a este problema. Se incluyen varios ejemplos a continuación.

En WO2014160987A2, se describe un polipéptido de fusión que comprende una nucleósido hidrolasa no específica (NH), una estero 24-c-metiltransferasa (SMT) y un polipéptido seleccionado del grupo formado por HSP70, una cisteín polipeptidasa B (CpB), una histona H2BN, un polipéptido A2 y un antígeno p21, o bien un factor 4a de iniciación eucariota (Leif), de *Leishmania spp.* como inmunoestimulante.

WO2014102471A1 propone una vacuna basada en fragmentos antigénicos/peptídicos seleccionados a partir de la proteína de virulencia PSA (de Antígeno de Superficie de Promastigotes) soluble, de *Leishmania*. En WO2014091463A1 se describe una vacuna frente a *Leishmania* que comprende al menos una de las proteínas HSP 83-1, MAPK y MAPK3.

En WO2013011184A1 se describe una vacuna basada en una molécula quimérica que comprende la proteína PFR1 de *L. infantum* o un fragmento de PFR1 con epítomos específicos inmunodominantes, y que puede incluir también HSP70.

ES2415516B2 se refiere a una quimera multicomponente para su uso como vacuna frente a la infección por *Leishmania spp.* en mamíferos, incluida la leishmaniosis cutánea y la

leishmaniosis visceral, que comprende 6 genes procedentes de *Leishmania infantum*: H2A, H2B, H3, H4, A2 y HSP70.

BR102014031331A2 propone una proteína inmonogénica recombinante que contiene epítomos inmunogénicos de varias proteínas de *Leishmania*: cadena alfa de la tubulina, proteínas de choque térmico HSP83.1 y HSP70 y cinesina, para su uso en la producción de vacunas, medicamentos y biofármacos para prevenir y tratar la leishmaniosis.

Se plantea, por lo tanto, la necesidad de nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas para uso humano o para prevenir la leishmaniosis canina y nuevas soluciones.

Explicación de la invención

Quimera sintética multiepitópica como vacuna y tratamiento frente a leishmaniosis en mamíferos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una quimera sintética multiepitópica que incluye múltiples epítomos de cuatro proteínas de *Leishmania spp.* Previamente descritas como inmunogénicas. Más concretamente, se trata de epítomos de cuatro histonas nucleosomales: H2A, H2B, H3 y H4, cuyos números de acceso en GenBank son: XP003392461, XP001463598, XP001463740 y XP001464339, respectivamente. Se ha realizado una selección de epítomos empleando algoritmos de programas de análisis de secuencias disponibles en la red, para elegir epítomos con alta afinidad de unión a complejos mayores de histocompatibilidad (CMH) de clase I y clase II de diferentes especies de mamíferos (epítomos promiscuos).

Las moléculas del CMH son proteínas que se codifican en más de 200 genes. En cada especie de mamífero los distintos *loci* que codifican el CMH son muy polimórficos; de hecho poseen la mayor variabilidad genética intraespecífica detectada en la Genética de Poblaciones. Es decir, cada *locus* concreto que participa en la codificación del complejo CMH posee multitud de variantes alélicas dentro de las poblaciones naturales de cada especie. El conjunto de alelos que definen una determinada combinación de CMH en un individuo se denomina haplotipo. En los seres humanos, estos genes se encuentran en distintas regiones o *loci* según si codifican el CMH de tipo I (*loci* HLA-A, HLA-B y HLA-C) o de tipo II (*loci* HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ). Mientras que en el ratón se encuentran en la región H-2 con los *loci* (K, D y L) y (I-A e I-E) para clase I y II, respectivamente. El polimorfismo de moléculas de CMH va a determinar diferencias en la capacidad y afinidad para unirse a los diversos epítomos.

En esta memoria descriptiva, por CMH-I se entiende el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I; por CMH-II se entiende el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Por HLA se entiende antígenos leucocitarios humanos (el CMH humano). Por H-2 se entiende el CMH de los ratones.

El amplio abanico de epítomos parasitarios que se hacen visibles al sistema inmunológico del hospedador estimula respuestas inmunitarias leishmanicidas en modelos superiores (como pueden ser perros, ratones y humanos), constituyendo una herramienta esencial en la lucha contra diferentes formas de leishmaniosis. Tras un análisis *in silico* de las secuencias de las cuatro histonas mencionadas más arriba, no todos los epítomos se comportan, *in vivo*, tal y como se predice por los algoritmos, por lo que la correcta selección de epítomos es fundamental para obtener una respuesta inmunitaria adecuada para proteger frente a leishmaniosis. Por ello, los péptidos obtenidos como resultado del análisis *in silico* de las secuencias de las cuatro proteínas seleccionadas se analizaron y modificaron para obtener

cuatro péptidos capaces de generar una respuesta inmunológica protectora frente a *Leishmania*.

5 Un primer análisis se basó en dos criterios: alta afinidad para el CMH-I y afinidad mantenida para el mayor número posible de alelos diferentes de los *loci* que codifican el CMH-I humano y murino. Un segundo análisis sirvió para identificar, para cada una de las cuatro proteínas, epítomos de alta afinidad para los alelos de los *loci* que codifican el CMH-II humano y murino.

10 En esta memoria descriptiva, por afinidad se entiende la fuerza de interacción entre cada uno de los epítomos con las diferentes alelos de los *loci* problema y por alta afinidad se entienden los valores de <0,5% para el CMH-I y de <2% para el CMH-II, siguiendo los criterios establecidos por los programas empleados en el análisis bioinformático y que comparan esta afinidad con un conjunto de 400.000 péptidos naturales aleatorios.

15 El siguiente paso fue un estudio pormenorizado de las secuencias preseleccionadas para identificar aquellas que se unían con alta afinidad al mayor número de alelos de los *loci* que codifican las moléculas del CMH de clase I humano y murino y que englobaban simultáneamente secuencias con alta afinidad de unión a un elevado número de alelos de los *loci* humanos y murinos que codifican el CMH de clase II.

20 Para finalizar, los péptidos seleccionados hasta ese momento se modificaron añadiendo aminoácidos en sus extremos hasta obtener 4 péptidos con, al menos, un epítomo de alta afinidad con un elevado número de alelos de los *loci* que codifican para CMH de clase I y II del hombre y el ratón. Los péptidos seleccionados, uno para cada proteína, se muestran en la
25 Tabla 1 y están caracterizados por SEQ ID NO: 1-4, con una longitud de 15-24 aminoácidos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una quimera sintética multiepitópica que incluye, en una secuencia continua, los péptidos caracterizados por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 organizados en cualquier orden. Por secuencia continua,
30 se entiende que las secuencias de los 4 péptidos se sitúan una detrás de la otra sin separación entre ellas o con una separación máxima de dos aminoácidos que permitan mejorar la configuración espacial de la quimera para su procesamiento y posterior unión a los CMH. La quimera sintética multiepitópica puede tener, por lo tanto, entre 70 y 76 aminoácidos. También se refiere a quimeras sintéticas multiepitópicas que presentan un 95% de identidad con cualquiera de las quimeras sintéticas multiepitópicas obtenidas al organizar en cualquier orden,
35 de forma continua, los péptidos caracterizados por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, dando lugar a quimeras de 70-76 aminoácidos. Preferentemente, la quimera sintética multiepitópica incluye los péptidos caracterizados por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 en el orden caracterizado por SEQ ID NO: 5, o bien, en el
40 mismo orden pero incluyendo hasta 2 aminoácidos entre péptidos, o bien una secuencia con un 95% de identidad con SEQ ID NO: 5, o bien una secuencia con un 95% de identidad con la secuencia que incluye los péptidos caracterizados por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 en el mismo orden e incluye hasta 2 aminoácidos entre ellos.

45 En esta memoria descriptiva, por porcentaje de identidad de una secuencia se entiende el porcentaje de coincidencias de los mismos aminoácidos entre dos secuencias alineadas, a lo largo de toda la longitud de ambas secuencias.

50 Estas quimeras sintéticas multiepitópicas son capaces de proteger a los animales frente a la infección por *Leishmania*, como muestra el examen de la respuesta inmunológica generada en ratones después de la inmunización con una de las quimeras sintéticas multiepitópicas en cuanto a los principales biomarcadores de protección, como las citoquinas proinflamatorias, la

producción de inmunoglobulinas específicas de los isotipos IgG1/IgG2 y las respuestas de las células T CD4+ y CD8+.

La leishmaniosis se produce cuando hay un desequilibrio entre una respuesta inmunológica (inadecuada) y el parásito, lo que favorece la aparición de sintomatología clínica y/o la proliferación del microorganismo. La inducción o la modulación de una respuesta inmunológica adecuada permite la remisión del cuadro clínico y la efectividad del tratamiento frente a la enfermedad.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una quimera sintética multiepitópica de entre las descritas más arriba, para su uso en mamíferos y, más concretamente, para su uso en la vacunación profiláctica y/o terapéutica frente a *Leishmania spp.*, especialmente en humanos y en perros. Además, la composición farmacéutica puede incluir otros elementos como pueden ser excipientes farmacológicamente aceptables, o bien vehículos o adyuvantes que mejoren o potencien su efecto. Entre los adyuvantes, preferentemente se utiliza saponina.

Otro aspecto de la invención se refiere a una vacuna profiláctica y/o terapéutica frente a *Leishmania spp.* que comprende una quimera sintética multiepitópica o una composición farmacéutica según se han descrito en los párrafos anteriores. Esta vacuna protege frente a leishmaniosis producidas por *L. infantum*, que origina tanto LV como LC por lo que las quimeras sintéticas multiepitópicas descritas en esta memoria y las composiciones farmacéuticas que las contienen son de interés para su uso en la elaboración de una vacuna profiláctica y/o terapéutica en humana y/o en perros.

Breve descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Muestra la producción (pg/ml) de citoquinas proinflamatorias (γ -interferón, IFN- γ ; interleuquina-12, IL-12) o antiinflamatorias (IL-10 e IL-4) en células de bazo, esplenocitos, de animales inmunizados con la quimera sintética multiepitópica caracterizada por SEQ ID NO: 5 (Seq5) o inoculados con los controles saponina (Saponin) o PBS. Para ello, se estimularon células dendríticas de médula ósea (BMDC) de ratones vírgenes con la quimera sintética multiepitópica caracterizada por SEQ ID NO: 5 (Seq5), con el antígeno soluble de *Leishmania* (SLA) o con PBS (N-E) y, posteriormente, se pusieron en cocultivo con esplenocitos procedentes de los grupos de animales inmunizados.

Figura 2.- Muestra el porcentaje de células diana infectadas (% BMDC, células dendríticas de médula ósea) y el número de amastigotes de *Leishmania* presentes por célula (Nº/BMDC) en cocultivos de BMDC vírgenes infectadas con *L. infantum* y, posteriormente, cocultivadas con células de bazo de animales inmunizados con la quimera sintética multiepitópica caracterizada por SEQ ID NO: 5 (Seq5), y de animales inoculados con los controles Saponin o PBS.

Figura 3.- Muestra la carga parasitaria (Log_{10}) en animales inmunizados con la quimera sintética multiepitópica caracterizada por SEQ ID NO: 5 (Seq5) y los animales inoculados con los controles Saponin y PBS y, posteriormente, infectados con *L. infantum*, tanto en bazo (B) como en hígado (H).

Realización preferente de la invención

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no pretenden ser limitativos de su alcance.

5

Ejemplo 1. Selección de péptidos.

Para obtener la quimera peptídica multiepitópica, en primer lugar, se seleccionaron múltiples epítomos capaces de unirse con alta afinidad a las moléculas del CMH-I y el CMH-II de humanos y ratones. Para ello, se utilizaron redes neuronales artificiales para la predicción de epítomos de alta unión a moléculas del CMH-I y el CMH-II de humanos y ratones y se realizó un análisis *in silico* a partir de cuatro antígenos de *Leishmania*, las cuatro histonas: H2A, H2B, H3 y H4.

Dado que la población humana tiene una gran diversidad genética de los *loci* que codifican los CMH, analizamos las proteínas a estudiar con respecto a todas las variaciones alélicas que codifican los CMH humanos disponibles en las bases de datos de los programas NetMHC (versión 4.0) (Andreatta M, Nielsen M Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics* (2016) 15;32(4):511-7; Nielsen M. y col. *Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. Protein Sci.*, (2003) 12:1007-17) y NetMHCII (versión 2.3) (Jensen KK, y col. *Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. Immunology* (2018) 154(3):394-406) para CMH-I y CMH-II, respectivamente. Se comprobaron los diferentes alelos humanos de los *loci* HLA (A, B, D y E) para los epítomos de clase I, y los alelos humanos para los *loci* HLA (DR, DP y DQ) para los epítomos de clase II, así como los alelos de los *loci* H-2 de ratones para las moléculas de clase I (K, D y L) y II (I-A, I-E) del CMH.

El análisis se realizó con cada una de las cuatro proteínas utilizadas siguiendo un protocolo semejante, que se resume a continuación. Se analizó, en primer lugar, la totalidad de la secuencia de cada proteína dividida en epítomos con un tamaño de 9 mers (aminoácidos) que cumplieran dos criterios: que presentaran alta afinidad para el CMH-I (entendiendo por afinidad la fuerza de interacción entre cada uno de los epítomos con las diferentes alelos de los *loci* problema) y que esta afinidad se mantuviera para el mayor número posible de alelos diferentes de los *loci* que codifican el CMH-I humano y murino. A continuación, se buscaron, a partir de la secuencia de cada proteína, epítomos de 15 mers con alta afinidad para los alelos de los *loci* que codifican el CMH-II humano y murino. De cada proteína se obtuvieron entre 100 y 133 péptidos diferentes, potencialmente útiles, a partir del programa informático.

Posteriormente, se realizó un estudio pormenorizado sobre las secuencias de 15 aminoácidos obtenidas. Se analizó cuáles se unían con alta afinidad al mayor número de alelos de los *loci* que codifican las moléculas del CMH de clase I humano y murino, considerando alta afinidad los valores <0,5%, siguiendo los criterios establecidos por los programas empleados en el análisis bioinformático y que comparan esta afinidad con un conjunto de 400.000 péptidos naturales aleatorios. Además, se estableció que dichas secuencias tenían que englobar, simultáneamente, secuencias de 9 aminoácidos que también presentaban alta afinidad de unión a un elevado número de alelos de los *loci* humanos y murinos que codifican el CMH de clase II (valores de <2% para este caso). Finalmente, algunas secuencias se alargaron añadiendo aminoácidos de forma manual en uno o en los dos extremos, sumando de uno en uno aminoácidos adyacentes a los péptidos preseleccionados de la proteína en un número variable hasta conseguir que en cada péptido existiera, al menos, un epítomo de alta afinidad con un gran número de alelos (Tabla 2) de los *loci* donde se encuentran todos los genes que codifican CMH de clase I y de clase II del hombre y el ratón.

Proteína	Péptido seleccionado	SEQ ID NO:
H2A	TAVLEYLTAELLELS	1
H2B	RSLKAINAQMSMSHRTMKIVNSYV	2
H3	EGLRFQSSAIMALQE	3
H4	ITRGCVRRMARRGGVK	4

Tabla 1. Péptido seleccionado de cada histona y SEQ ID NO que lo caracteriza.

	CMH-I				CMH-II			
SEQ ID NO:	HLA-A	HLA-B	HLA-C y E	H-2	HLA-DR	HLA-DP	HLA-DQ	H-2
1	13	6	8	1	5	9	15	-
2	16	12	9	-	16	2	11	4
3	10	3	8	-	17	5	12	3
4	-	6	-	-	6	1	3	2

Tabla 2. Número de variantes alélicas de cada *loci* con los que muestra alta afinidad cada uno de los péptidos.

5

Como resultado, seleccionamos cuatro péptidos (uno para cada proteína, como se muestra en la Tabla 1), caracterizados por SEQ ID NO: 1-4 y con una longitud de aminoácidos de 15-24, que tienen el mayor número de epítomos de alta afinidad y de unión restringida al CMH-I (entendiendo por restringido que se une esencialmente al CMH-I), así como al menos un epítomo adyacente o solapado de CMH-II restringido también por su alta puntuación, de acuerdo con los valores de afinidad descritos anteriormente, y con valores elevados en cuanto a su afinidad por el mayor número de alelos humanos y murinos en los análisis de los programas bioinformáticos. Estas características se muestran en la Tabla 2.

10

15 **Ejemplo 2. Construcción de una quimera sintética multiepitópica.**

Una vez seleccionados los 4 péptidos multiepitópicos según el ejemplo 1, se combinaron en una quimera según el orden: SEQ ID NO: 1 - 2 - 3 - 4, dando lugar a la secuencia aminoacídica TAVLEYLTAELLELSRSLKAINAQMSMSHRTMKIVNSYVEGLRFQSSAIMALQEITRGCVRRMA

20

RRGGVK, caracterizada por SEQ ID NO: 5, que contiene epítomos de alta unión de las cuatro histonas H2A, H2B, H3 y H4.

25

Utilizando los programas informáticos detallados en el ejemplo 1, se analizó en profundidad la quimera caracterizada por SEQ ID NO: 5, comprobando que conservaba los epítomos de clase I y II del CMH. Además, se analizó empleando un nuevo *software* de predicción de epítomos con afinidad para adición a linfocitos T y linfocitos B (NetTepi, versión 1.0) (Trolle T, Nielsen M. NetTepi: *an integrated method for the prediction of T cell epitopes*. *Immunogenetics* (2014). 66(7-8):449-56). La quimera caracterizada por SEQ ID NO: 5 fue positiva para 9 de los 13 alelos diferentes del CMH humano (HLA) de los supertipos comunes HLA-A y B. Se consideran supertipos comunes aquellas agrupaciones de variaciones alélicas con características estructurales y funcionales comunes que les permiten reconocer epítomos peptídicos muy similares. Esta quimera presentó, además, un epítomo de 9 mers de alta afinidad para, al menos, una variante alélica de los *loci* que codifican las moléculas del CMH-I de chimpancé, macaco, vaca y cerdo. Finalmente, y para descartar posibles efectos colaterales de autoinmunidad, se hizo un análisis de la quimera multiepitópica utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para descartar que existiera una identidad superior al 90% con el proteoma del hombre y del ratón.

30

35

Ejemplo 3. Inmunización con la quimera sintética multiepitópica caracterizada por SEQ ID NO: 5.

Para evaluar la inmunogenicidad de la quimera sintética multiepitópica caracterizada por SEQ ID NO: 5, se realizaron inoculaciones por vía subcutánea en tres grupos de ratones (n = 8/grupo). En los animales de un grupo, denominado Seq5, se inocularon 50 µg de la quimera sintética caracterizada por SEQ ID NO: 5 y 25 µg de saponina, como adyuvante; en los animales de otro grupo, grupo control Saponin, se inocularon 25 µg de saponina; en el grupo control PBS, se le inoculó PBS (tampón en el que se vehiculizaron tanto la quimera sintética multiepitópica caracterizada por SEQ ID NO: 5 como el adyuvante). La inoculación se realizó en la almohadilla plantar trasera izquierda los días -60, -45 y -30, con respecto al día cero de infección, con un volumen total de 50µl.

Ejemplo 4. Evaluación de la inmunogenicidad de la quimera sintética multiepitópica caracterizada por SEQ ID NO: 5.

Los ratones inmunizados con la quimera caracterizada por SEQ ID NO: 5, siguiendo las indicaciones del ejemplo 3, presentaron una respuesta inmunitaria caracterizada por un perfil de respuesta celular Th1 de protección con producción de citoquinas proinflamatorias (IFN-γ, IL-12) frente al perfil presentado por los controles Saponin y PBS que tuvieron una respuesta inmunitaria de tipo Th2 predominantemente, compatible con un perfil de susceptibilidad frente a una infección por *Leishmania* y caracterizada por la producción de citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10). El predominio de la respuesta de tipo Th1 coincide con una reorientación de la respuesta humoral específica frente a la quimera sintética multiepitópica al isotipo IgG2a relacionada con una respuesta Th1. El desplazamiento de la respuesta inmunitaria en el grupo inmunizado con la quimera caracterizada por SEQ ID NO: 5, se correlaciona con una mayor actividad leishmanicida en células diana infectadas con *Leishmania*.

En la figura 1 se muestra la producción de citoquinas en células del bazo, esplenocitos, de animales inmunizados según se describe en el ejemplo 3. Se utilizaron células dendríticas procedentes de médula ósea (BMDC) vírgenes y estimuladas con antígeno soluble de *Leishmania* (SLA; producido con los sobrenadantes obtenidos después de haber lisado cultivos de promastigotes de *Leishmania* obtenidos después de la su sonicación y posterior centrifugación), barras grises; o estimuladas con la quimera caracterizada por SEQ ID NO: 5, barras blancas; como control negativo se utilizaron BMDC sin estimular, indicadas como N-E con barras negras. Las BMDC se cocultivaron con células del bazo, esplenocitos, de los animales inmunizados previamente como se indica en el ejemplo 3. La producción de citoquinas (pg/ml) se cuantificó mediante la técnica de ELISA. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar (S.D). Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0,05$; ##, $P < 0,001$) entre los grupos inmunizados y los dos grupos de control (Saponin y PBS). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,001$). En la figura 1 se refleja cómo los esplenocitos procedentes del grupo inmunizado con la quimera caracterizada por SEQ ID NO: 5 producen una mayor cantidad de IFN-γ, IL-12 y que esta producción es específica, en respuesta a una estimulación previa con la quimera caracterizada por SEQ ID NO: 5 o con un conjunto de antígenos totales de *Leishmania* (SLA), pero no ocurre al estimular con PBS. Los esplenocitos procedentes de animales inmunizados con Saponina o PBS no muestran esta producción de citoquinas proinflamatorias ante ninguno de los estímulos (SLA o quimera caracterizada por SEQ ID NO: 5).

En la figura 2, se observa el porcentaje de células diana infectadas (% BMDC) y el número de amastigotes intracelulares detectados por célula (Nº/BMDC) a las 24 y 72 horas de incubación postinfección. La actividad leishmanicida de la quimera caracterizada por SEQ ID NO: 5

(indicada en la figura como Seq5) se evaluó en BMDC. Las BMDC vírgenes infectadas con *L. infantum* se cocultivaron con esplenocitos de animales previamente inmunizados con la quimera caracterizada por SEQ ID NO: 5 como se indica en el ejemplo 3, y con esplenocitos de animales previamente inoculados con los dos controles utilizados según el ejemplo 5. Los parámetros de células infectadas y número de amastigotes intracelulares se determinaron por microscopía óptica. Los datos se presentan como la media $\pm$ S.D. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0,05$; ##, $P < 0,001$) entre los grupos inmunizados (barras negras) y los dos grupos de control: Saponin (barras grises) y PBS (barras blancas). Como se muestra en la figura 2, se observa un incremento significativo en el potencial leishmanicida que inducen en las BMDC infectadas con *L. infantum*, de los esplenocitos procedentes de los animales inmunizados con la quimera SEQ ID NO: 5 con respecto a los esplenocitos de los animales de los grupos controles. El incremento de la capacidad leishmanicida se observa con una notable reducción del porcentaje de BMDC infectadas a 24 y 72 horas, así como un menor número de amastigotes intracelulares. Este resultado se correlaciona con la respuesta inmunitaria protectora predominante en el grupo inmunizado con SEQ ID NO: 5 tal y como se describe más arriba en este ejemplo y figura 1.

Ejemplo 5. Protección frente a *L. infantum* en el modelo murino de leishmaniosis visceral.

30 días después de la última inmunización realizada según se describe en el ejemplo 3, se realizó una infección con 5×10^5 promastigotes infectantes de *L. infantum*, por vía intravenosa, en los 3 grupos de animales (que hemos denominado Seq5, Saponin y PBS). Trascurridas 6 semanas desde la infección, se realizó la eutanasia de los animales y se valoró la carga parasitaria en los órganos diana de la LV. El recuento de parásitos se realizó mediante diluciones decimales de macerados de bazo e hígado, por separado, y su posterior observación al microscopio. Como se puede apreciar en la figura 3, se observó que los animales inmunizados con la quimera caracterizada por SEQ ID NO: 5 (Seq5) presentaron una carga de parásitos menor tanto en el bazo (B) como en el hígado (H), en comparación con los grupos Saponin y PBS. Es decir, la inmunización con SEQ NO: 5 es capaz de disminuir drásticamente la cantidad de *Leishmania* que está presente en hígado y bazo con respecto a los grupos controles.

Por lo tanto, concluimos que la respuesta inmunológica inducida durante la inmunización con la quimera caracterizada por SEQ ID NO: 5 es capaz de proteger frente a una infección con *Leishmania* y, más específicamente, con *L. infantum*.

Texto libre de la lista de secuencias

SEQ ID NO: 5
 Secuencia artificial
 Quimera multiepitópica compuesta por SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4 de *Leishmania infantum*.

REIVINDICACIONES

1. Quimera sintética multiepitópica que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 5.
- 5 2. Composición farmacéutica que comprende la quimera sintética multiepitópica definida en la reivindicación 1, para su uso en mamíferos.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 que comprende un excipiente, un vehículo y/o un adyuvante farmacológicamente aceptables.
- 10 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que el adyuvante es saponina.
5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2-4 para su uso en la vacunación profiláctica y/o terapéutica frente a *Leishmania spp.*
- 15 6. Vacuna profiláctica y/o terapéutica frente a *Leishmania spp.* que comprende una quimera sintética multiepitópica según la reivindicación 1 o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2-5.
- 20 7. Vacuna profiláctica y/o terapéutica según la reivindicación 6 para su uso frente a *Leishmania infantum*.
8. Vacuna profiláctica y/o terapéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-7 para su uso en humana y/o en perros.
- 25

Fig 1

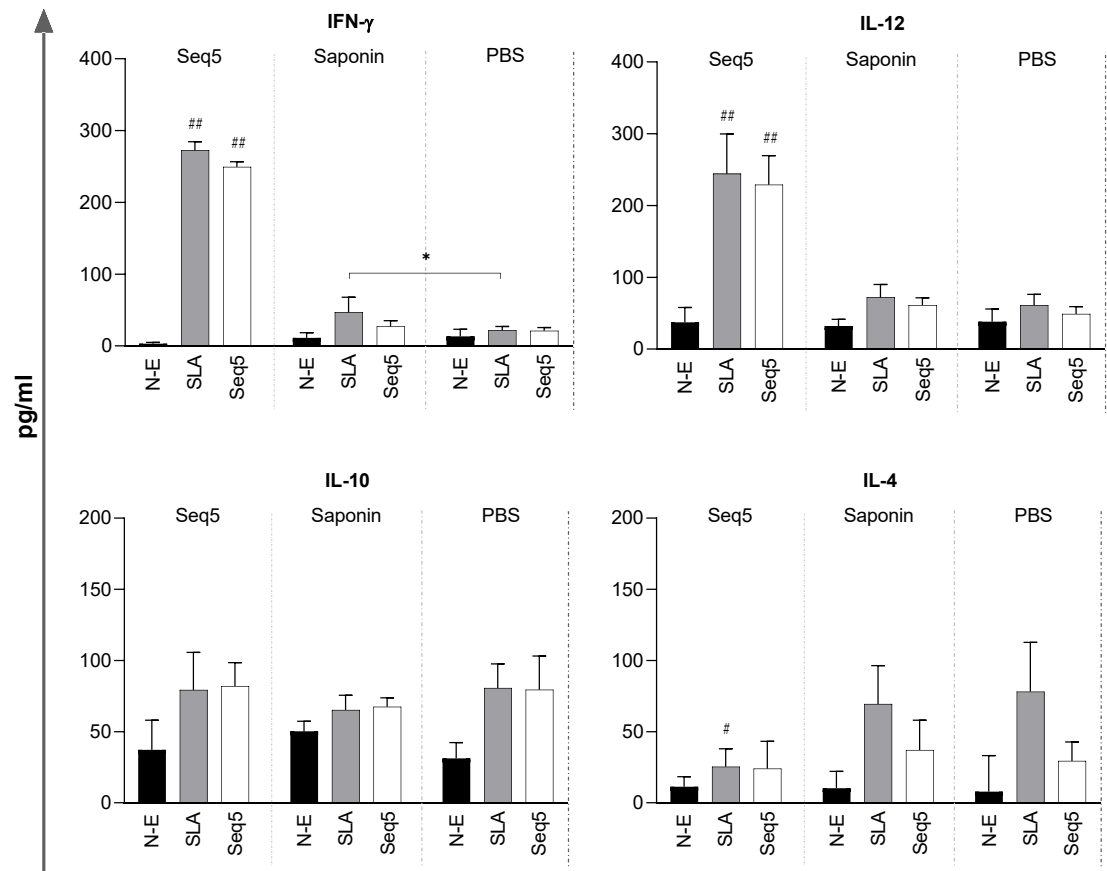


Fig. 2

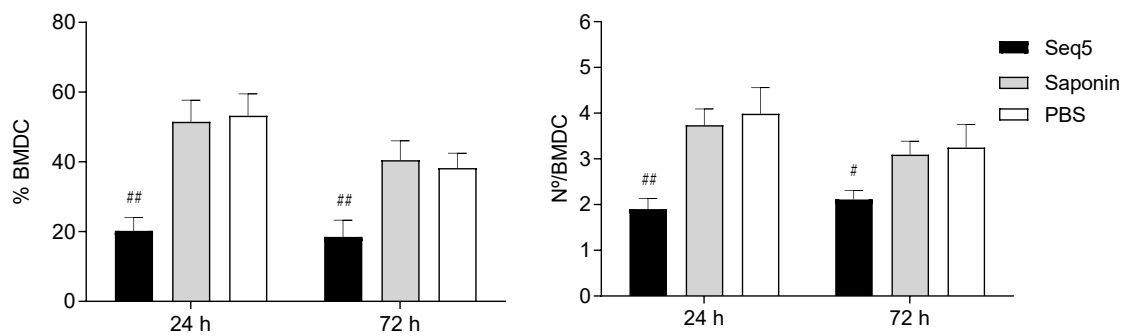


Fig.3

