



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
 Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo  
 Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 9302386-3 A**

(22) Data de Depósito: 17/06/93

(43) Data de Publicação: 17/01/95 (RPI 1259)

(51) Int Cl<sup>5</sup>:  
 A61K 39/008,  
 G01N 33/569,  
 C12P 19/02,  
 C12P 19/04



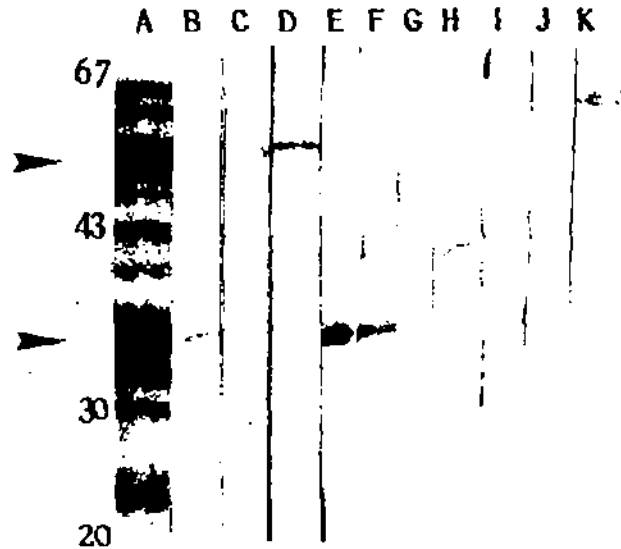
(54) Título: Composição contendo frações de células de leishmania, denominadas antígeno FML "fucose mannose ligand" ou "ligante de fucose-mannose", uso do antígeno FML e de suas subfrações e componentes para as aplicações em imunodiagnóstico específico da leishmaniose visceral humana e animal, para aplicações em vacinação, tratamento ou imunoterapia contra a leishmaniose visceral humana e canina.

(57) Resumo: Patente de invenção: "Composições contendo frações nativas de células de Leishmania, denominadas antígeno FML "Ligante de Fucose Manose", e do uso deste antígeno FML e de suas subfrações e componentes: glicoproteínas de 35, 55 Kd, e outras proteínas, adicionadas ou não de veículos farmacológicos, para as aplicações em imunodiagnóstico específico da leishmaniose visceral humana e animal, e para as aplicações em vacinação, tratamento ou imunoterapia contra a leishmaniose visceral humana e canina."

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio de Janeiro (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Clarisa B. Palatnik de Souza;  
 Radovan Borojevic

(74) Procurador: Nilza Xavier Kover



Relatório Descritivo da Patente de Invenção: COMPOSIÇÕES CONTENDO FRAÇÕES DE  
CÉLULAS DE *LEISHMANIA*, DENOMINADAS ANTÍGENO FML "FUCOSE MANNOSE  
LIGAND" OU "LIGANTE DE FUCOSE-MANNOSE"; USO DO ANTÍGENO FML E DE SUAS  
SUBFRAÇÕES E COMPONENTES PARA AS APLICAÇÕES EM IMUNODIAGNÓSTICO  
5 ESPECÍFICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E ANIMAL, E PARA AS  
APLICAÇÕES EM VACINAÇÃO, TRATAMENTO OU IMUNOTERAPIA CONTRA A  
LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E CANINA.

Esta invenção trata da obtenção de compostos, extraído e purificado a partir de  
promastigotas de *Leishmania donovani* LD18 Sudan. Estes compostos podem ser, após a  
10 sua preparação final, utilizados para desenvolver o imunodiagnóstico específico da  
Leishmaniose Visceral humana ou animal. Quando injetados em combinação com  
adjuvantes, estes compostos induzem a proteção contra a Leishmaniose Visceral,  
evidenciada pela resposta sorológica específica, e resposta celular comprovada por teste  
de intradermoreação e resposta proliferativa de linfócitos, ataso no aparecimento da  
15 morbidade da doença e diminuição dos níveis da hepatosplenomegalia e infecção em baço  
e fígado.

A Leishmaniose Visceral Humana é uma doença crônica, debilitante e frequentemente  
fatal em crianças e adultos jovens. O diagnóstico específico e precoce é imprescindível  
para a indicação do tratamento antes de aparecimento dos sintomas graves e de  
20 estabelecimento da morbidade plena da doença. Os métodos atualmente utilizados para  
este fim apresentam ainda diversas limitações.

Não existe até o presente vacina contra a Leishmaniose Visceral, nem no Brasil nem no  
exterior.

## PROPOSTA

### **FML - "FUCOSE MANNOSE LIGAND" ou "LIGANTE FUCOSE-MANOSE"**

Em pesquisas recentes elaboramos um produto denominado Antígeno FML, "Fucose Mannose Ligand" ou "Ligante Fucose-Manose" de *Leishmania donovani*: um complexo glicoprotéico, cuja porção carboidrato apresenta 10% de Fucose e 47% de Manose, justificando o nome utilizado. Este complexo inibe fortemente a infecção de macrófagos peritoneais de camundongo por promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, sendo espécie-específico dentro do género *Leishmania*. O FML é fortemente imunogênico em coelhos, hamsters, e camundongos, elicitando a intensa produção de anticorpos; ele é antigênico em seres humanos, sendo reconhecido por altos níveis de anticorpos específicos.

A análise bioquímica inicial do FML revelou que este é um complexo glicoprotéico contendo 29% de açúcar neutro, 44% de proteína, 11% de fosfato e traços de hexosaminas, composto por bandas protéicas de pesos moleculares variados, de 9 a 95 kDa (Figura 1), revelando-se em algumas a presença de carboidratos: 36 e 54 a 68 kDa. Na porção glicídica do FML se destaca a presença de 10% de fucose e 47% de manose. Também foi possível observar a presença de 30% de glicose, 12 % de galactose, e xilose em quantidade traço .

A análise de aminoácidos do FML revelou a presença dos: ácido glutâmico, alanina, ácido aspártico e glicina, em quantidade variáveis de 20 a 10%, serina, histidina, lisina, leucina, threonina, prolina e valina, entre 10 e 5%, e arginina, methionina, isoleucina, tirosina e fenilalanina, entre 5 e 2%.

O FML é obtido a partir do extrato aquoso de promastigotas de *L. donovani* LD18 de acordo com a seguinte metodologia:

Para obtenção de massa de células, promastigotas de *L. donovani* são inoculados em tubos de rolha contendo meio de cultura bifásico apropriado para o isolamento de *Leishmania* sp.: fase sólida meio NNN : 37 g/l Brain & Heart Infusion - BHI, 20 g/l Agar 9 g/l de NaCl, e 10% de sangue defibrinado de coelho (10%), e fase líquida : 37 g/l BHI, 0.02 g/l

## P 19302386

ácido fólico, e 0.01 g/l hemina, suplementado com 5 - 15% de soro fetal bovino. O crescimento celular realiza-se em estufa biológica, na temperatura de 22-30°C. Após 4-6 dias são atingidas concentrações de  $10^6$  a  $10^8$  promastigotas/ml, e as culturas em fase exponencial são transferidas para frascos Erlenmeyer de 1L contendo 200 a 400 ml de  
5 meio de cultura monofásico (fase líquida) e mantidos sob agitação por 4 a 6 dias, até atingir uma concentração de  $10^8$ - $10^{10}$ . Estas culturas, em fase logarítmica de crescimento, são então transferidas para frascos Erlenmeyer de 3L, contendo 1L de Meio de cultura monofásico e mantidas nas condições citadas até atingir a fase estacionária com concentrações de promastigotas de  $10^9$  a  $10^{13}$  células/ml.

10 A massa celular obtida é recolhida por centrifugação a 6000 g, 5-20 min, lavadas 3 vezes por centrifugação em solução salina de NaCl 0.9% e mantidas a -20°C até o momento da extração.

Para obtenção do extrato aquoso, as células são descongeladas, ressuspensas em água destilada e mantidas sob agitação dentro de banho de gelo por 5-75 min. A seguir, a  
15 suspensão é centrifugada a 6000g por 5-20 min, o sobrenadante é recolhido, enquanto o resíduo é re-extraído em condições idênticas. Os sobrenadantes das duas extrações são aquecidos a 100°C por 10-30 min, para desnaturação de proteases endógenas, seguindo-se a centrifugação da mistura a 48000 g por 10-25 min. O resíduo precipitado é desprezado e os sobrenadantes são concentrados e liofilizados.

20 A purificação inicial do FML é realizada por cromatografia de gel filtração em coluna de "Biogel P10" de 100-200 mesh, equilibrada e eluída com água destilada e previamente calibrada com "Blue dextran". Os perfis de eluição são realizados através de dosagens de carboidrato e proteína das frações eluídas. A cromatografia é realizada a 20-30°C sob um fluxo de 9-20 ml/h.

25 O antígeno FML é colhido no volume de exclusão da coluna, e a seguir liofilizado; o seu grau de purificação é evidenciado através de dosagens químicas, cromatografia

# PROJETO

gás/líquida dos seus derivados aldol acetatos, SDS-PAGE, e ELISA contra os soros padrões de títulos conhecidos.

Após a caracterização, o antígeno FML é diluído de acordo com o objetivo do seu uso : testes para imunodiagnóstico específico ou vacina para a Leishmaniose Visceral.

## 5 FML NO DIAGNOSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

Até o presente momento o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Humana ou Calazar é feito através de:

- EXAME CLÍNICO, para identificação dos sintomas compatíveis com a doença: febre, emagrecimento, linfadenopatia, sintomas respiratórios, hepatosplenomegalia, 10) hipergamaglobulinemia, caquexia e depressão da resposta imune celular.
- EXAME PARASITOLÓGICO, para pesquisa da presença dos parasitas no material colhido por biópsia de medula óssea esternal ou femoral. O parasita se aloja em macrófagos e monócitos de baço, fígado, linfonodos e medula óssea, e não pode ser detectado no sangue periférico.
- 15) - EXAME SOROLÓGICO para a pesquisa de anticorpos específicos anti-Leishmania por reações de imunofluorescência, ELISA, etc.

Contudo, todos os exames acima citados apresentam limitações, quais sejam:

- EXAME CLINICO: Requer profissionais especializados capazes de discernir entre os sintomas característicos da Leishmaniose Visceral Humana e outras doenças parasitárias 20) de ocorrência frequentemente concomitante em áreas endêmicas. Os sinais clínicos aparecem claramente quando a infecção já se encontra em estado avançado, e quando o tratamento do paciente debilitado e sofrendo a depressão do sistema imune causada pela Leishmaniose é de eficácia limitada. Por outro lado, ficam sem diagnóstico numerosos casos subclínicos ou precínicos, resultantes da infecção mais atenuada ou recente, 25) facilitando a difusão da doença nas áreas endêmicas.
- EXAME PARASITOLÓGICO: Trata-se da punção da medula óssea: coleta do material por aspiração, esfregaço do mesmo sobre lâmina, coloração pelo método de Giemsa e

## PROGNOSE

pesquisa da presença das formas amastigotas de *Leishmania donovani*. A sensibilidade deste método é baixa, com alto risco de resultados falsos negativos, se a punção não for realizada durante a fase ativa da doença. A punção medular é uma intervenção muito agressiva, com risco inerente das complicações por sangramento ou infecção, 5 requerendo uma habilidade especial do operador. Ela não pode ser usada repetidamente em casos do diagnóstico duvidoso, ou para acompanhamento da cura parasitológica após o tratamento quimioterápico. Este método não é portanto eficiente numa avaliação prognóstica nem como critério de cura da doença.

- **EXAME SOROLÓGICO:** O sangue colhido deve ser levado para o laboratório, para 10 obtenção dos soros e detecção qualitativa e quantitativa dos anticorpos ou antígenos circulantes.

Os testes de diagnóstico sorológico utilizando métodos de fluorescência e aglutinação, menos sensíveis e específicos, estão dando passo aos mais modernos e práticos como por exemplo: o imunoenzimático-ELISA.

15 A utilização do antígeno bruto solúvel de *Leishmania chagasi*, no ensaio de ELISA demonstrou grande sensibilidade. Entretanto, o mesmo tipo de extrato obtido de *Leishmania mexicana amazonensis* mostrava valores de absorvância ainda maiores do que observados com o antígeno homólogo, com os mesmos soros de pacientes de Leishmaniose Visceral, indicando uma falta de especificidade. Este antígeno bruto deve 20 portanto estar constituído por alguns componentes comuns à ambas espécies, talvez um marcador do gênero *Leishmania* que seria incapaz de discriminar entre soros de pacientes com Leishmaniose Visceral ou Tegumentar. No mesmo trabalho, os autores recomendam o uso de antígeno obtido na espécie de *Leishmania* que causa a doença na região, descrevendo que os extratos das espécies africanas, como *L. donovani* Sudan não se 25 mostrava eficiente no diagnóstico dos casos de Leishmaniose Visceral Americana oriundos da Bahia, Brasil.

## P T 9 3 0 2 3 8 8

Os nossos resultados com o antígeno purificado FML, descritos a continuação, demonstram pelo contrário que o FML obtido a partir de *L. donovani* é capaz diagnosticar com alta sensibilidade e especificidade os pacientes com Leishmaniose Visceral Americana de diversas regiões do Brasil. Numa avaliação comparativa, o FML demonstra  
5 ser portanto um antígeno muito potente e de caráter universal.

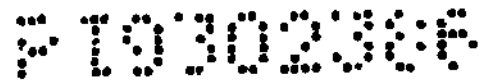
Por outro lado, comparando o ensaio de ELISA com a punção de medula óssea, foi observado que esta última confirma apenas os casos de Leishmaniose Visceral avançados, não podendo ser utilizada como critério prognóstico nem de avaliação de cura.

Através do ensaio imunoenzimático de "Western Blot", foi purificada da *L. chagasi* uma  
10 fração de 63 kDa, com a qual aumentam a sensibilidade do ensaio de ELISA. Não se analisa neste trabalho a reatividade cruzada com soros de Leishmaniose Tegumentar, sendo esta muito provável uma vez que esta fração foi reconhecida como um marcador do todo o gênero *Leishmania*. Numa modificação do ensaio ELISA, foi utilizada proteína A como revelador, comparando o extrato bruto com uma proteína de 63 kDa recombinante  
15 na concentração de 1 µg/poço. A análise da especificidade do ensaio foi feita a respeito de Doença de Chagas, Tuberculose e Lepre, porém não a respeito da Leishmaniose Tegumentar.

Recentemente, utilizando duas proteínas recombinantes de choque térmico HSP 70 e HSP 90, foram obtidos resultados de baixa sensibilidade.

20 Comparando com os antígenos semipurificados e recombinante citados previamente, o FML utilizado no mesmo ensaio de ELISA apresenta altos valores de especificidade e sensibilidade, discriminando com segurança os soros de pacientes com Leishmaniose Visceral clínica, subclínica, pacientes curados e soros normais. Uma outra vantagem do antígeno FML sobre todos os outros citados, é o diagnóstico diferencial de Calazar,  
25 Doença de Chagas e Leishmaniose Tegumentar.

O FML, agora descrito possui todas as vantagens que devem ser atribuídas a um novo antígeno para diagnóstico de uma doença, tais como:



- Ser original, não existindo nenhum similar no mercado, ou em nível experimental, nacional ou internacional.
  - Ser de diagnóstico rápido, possibilitando a leitura após 3 horas.
  - Ser de baixo custo.
- 5 - Ser útil no diagnóstico e prognóstico da Leishmaniose Visceral em seres humanos, distinguindo tanto a doença ativa como a doença pré-clínica ou subclínica, ou seja a "Leishmaniose infecção" da "Leishmaniose doença" ou Calazar.
- Ser útil para o acompanhamento dos tratamentos dos pacientes e como critério de cura da doença.
- 10 - Ser estocável em geladeira comum.
- Ser de fácil manipulação, não contaminante, não tóxico ou irritante e não requerendo pessoal especializado.
  - Ser muito potente antigenicamente, eficiente no diagnóstico em concentrações muito baixas, de 2,5 mg/ml a 0.125 µg/poço.
- 15 - Ser de fácil utilização em inquéritos epidemiológicos.
- Apresentar 100% de correlação com os dados clínicos dos pacientes,  $p < 0.01$ .
  - Apresentar 100% de sensibilidade e 97% de especificidade no imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral, distinguindo-os da Leishmaniose Tegumentar e Doença de Chagas.
  - De uso potencial no controle sorológico da população de cães e canídeos, reservatórios
- 20 naturais da doença nas áreas endêmicas.

#### **ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBFRAÇÕES DO FML:**

Entre os componentes do FML, a glicoproteína de peso molecular 36-kDa, denominada GP36, foi identificada como o antígeno predominante, reconhecido pelo soro hiperimune de coelho, produzido contra o FML total (Figura 2). Utilizando este soro, através de ensaios

25 de imunoprecipitação e imunofluorescência, confirma-se a presença da GP36 na superfície de *Leishmania donovani* LD15, tanto na forma promastigota como na forma amastigota (Figura 3, Tabela 3).



## PROPOSTA

Anticorpos monoclonais obtidos contra o FML a partir de linfócitos de camundongos isogênicos BALB/c reconhecem predominantemente a GP38. Dos 23 anticorpos de tipo IgG obtidos, 22 reagem exclusivamente com a GP38, confirmando a sua relevância antigênica também no sistema experimental do camundongo (Figura 4). A alta suscetibilidade demonstrada no tratamento com periodato de Na, indica a natureza glicídica de epítopos da GP38 envolvidos na reação com anticorpos monoclonais, anticorpo AC E10, e confirmam portanto a sua natureza glicoprotéica. Esta fração contém entre os amino-ácidos: entre 20 e 10% de ácido glutâmico, glicina e serina, entre 10 e 5% de ácido aspártico, histidina, alanina, threonina e leucina, e entre 5 e 2% valina e isoleucina.

10 Não existe reatividade cruzada entre o FML e a glicoproteína 63, GP63, isolada previamente de *Leishmania*. Anticorpos monoclonais específicos, LÜ-3.2 e LÜ-3.9, obtidos por David Russell contra a GP63, não desenvolvem nenhuma reação com FML, nem no ensaio de Western Blotting, nem no de ELISA considerado o mais sensível (Figura 4). Este resultado é coerente e previsível, considerando os diferentes métodos de extração. A  
15 extração aquosa do FML, incluindo dupla aquecimento a 100°C, privilegia os a obtenção dos glicoconjugados cuja fração glicídica é resistente a estas condições.

Um segundo componente antigênico do FML é a glicoproteína de 55 kDa, reconhecida por 7 anticorpos monoclonais do tipo IgM e apenas 1 do tipo IgG. Esta fração contém entre os amino-ácidos: entre 30 e 10% de ácido glutâmico, glicina, ácido aspártico e alanina, e  
20 entre 10 e 3% de threonina e serina.

Seguem as descrições dos métodos desenvolvidos e testados no imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral, utilizando o FML.

### TESTE DE ELISA COM FML PARA IMUNODIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DO GALAZAR:

25 O potencial imunodiagnóstico do FML no ensaio de ELISA, foi analisado inicialmente utilizando a concentração de 40 µg/ml. O teste discriminou os soros dos casos de Leishmaniose Visceral Humana ativa, confirmados clínica- e parasitologicamente, dos

## P I B O 2 3 0 6

soros normais, soros de pacientes com Leishmaniose Cutânea e Muco-cutânea, e soros de pacientes Chagásicos de baixa, média ou alta reatividade (Tabela 1). Antígenos brutos ou semi-purificados são comumente utilizados na faixa de concentração 20-50 µg/ml, porém sendo o FML um antígeno de um grau de purificação maior, procedemos a titular o mesmo

5 no sistema descrito, na expectativa de determinar a dose ótima para o ensaio de ELISA

A concentração mínima ideal do FML no teste de ELISA é 2.5 µg/ml. Nesta concentração, com mínimo gasto de antígeno, foram detectadas as mesmas diferenças entre os soros de pacientes com Leishmaniose Visceral ou Tegumentar, com Doença de Chagas e soros normais.

10 A análise subsequente (Tabela 2) de 155 amostras de soros humanos provenientes de áreas endêmicas no interior do estado de Alagoas ou epidêmicas no Natal e no interior do Rio Grande do Norte, confirma que o teste de ELISA utilizando 2.5 mg/ml de FML como antígeno, claramente reconhece:

- os soros normais de área endêmica e de área não endêmica,
- 15 - os soros de pacientes com a Leishmaniose Visceral ativa, confirmado por exame parasitológico e clínico, com reatividade extremamente alta,
- os soros da área endêmica de reatividade baixa, com provável contato prévio com o parasita e/ou cura espontânea,
- os soros de reatividade moderadamente alta, da forma sub-clínica da Leishmaniose
- 20 Visceral,
- os soros de pacientes curados,
- os soros de pacientes com Leishmaniose Tegumentar,
- os soros de pacientes com Doença de Chagas.

O antígeno FML se mostra portanto um potente reagente no diagnóstico, prognóstico e

25 avaliação da cura da Leishmaniose Visceral humana após tratamento, de fácil utilização em teste rápido e econômico.

## Procedimento

O antígeno FML para diagnóstico pode ser estocado na solução de carbonato/bicarbonato de Na, pH 9,8, na presença de tómerosol, 1:10000, em tubos de plástico de volume adequado, sem perder a atividade.

Para a realização do teste, as placas de microtitulação são sensibilizadas com antígeno, procedendo-se depois a etapas de bloqueio com PBS 0,018M, de pH 7,2, contendo Molico 1%, e Tween 20%, seguidas de incubação com as diluições apropriadas de soros testes por 1h a 37°C, lavagens com PBS e incubação com o conjugado Proteína A-Peroxidase. Finalmente a revelação da reação se realiza com OPD em tampão citrato-Na PH 4,9 e a leitura visual ou espectrofotométrica das absorbâncias a 492 nm.

10 Análise qualitativa do teste ELISA com FML apresentou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 97%.

Análise quantitativa do teste de ELISA.

(1) Para cada soro determina-se em triplicatas o Título, inverso da última diluição no qual se detecta absorbância a 492 nm, e o Score, soma das absorbâncias a 492 nm de 15 todas as diluições até o título. Ambas as medidas demonstraram ter uma correlação com os dados clínicos com nível de significância de 100% com  $p < 0.01$  (Tabela 2).

(2) Para cada soro determina-se, em triplicatas, a absorbância a 492 nm, das diluições 1/100 e 1/400. Neste tipo de determinação, que necessita menos antígeno, tempo e trabalho, é possível discriminar com segurança os soros de pacientes com a doença ativa 20 e soros de pacientes subclínicos do resto dos soros controles utilizados na padronização (Tabela 2).

A análise quantitativa do teste ELISA com FML apresenta 100% de sensibilidade e 97% de especificidade.

IMUNODIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA COM 25 FML, PELO MÉTODO DE WESTERN BLOTTING:

Na análise da reatividade de soros humanos, em diluição 1/50-1/100, contra o FML, usando 30 µg, observa-se que soros de pacientes com Leishmaniose Tegumentar, assim

## PROTEÇÃO

como alguns soros de doadores normais, reconhecem no FML a banda de 55 kDa. Esta reatividade inespecífica aparece também nos soros de pacientes com Calazar.

A fração GP36 do FML é reconhecida unicamente pelos soros de pacientes com Calazar, tornando esta glicoproteína o antígeno específico para o diagnóstico do Calazar em humanos (Figura 5).

A fração GP36 do FML foi também detectada como antígeno circulante no soro de hamsters CB infectados com *L. donovani* (LD1S). A detecção deste antígeno nos soros dos pacientes ou animais infectados por *L. donovani* pode ser portanto utilizada como marcador da infecção ativa, e usada no diagnóstico e no controle subsequente da cura parasitológica, mediante o uso de anticorpos monoclonais específicos, ou soros de alto título de anticorpos contra GP36.

### CONCLUSÃO

O FML E SEUS COMPONENTES SÃO INSTRUMENTOS DE USO VALIOSÍSSIMO NO DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA CURA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NAS COMUNIDADES HUMANAS, DE USO POTENCIAL NA AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EM CANÍDEOS E OUTROS RESERVATÓRIOS NATURAIS DA DOENÇA, E PORTANTO NO CONTROLE EPIDEMIOLÓGICO DESTA GRAVE DOENÇA DE INCIDÊNCIA CRESCENTE NO BRASIL.

### FML NA PROTEÇÃO CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL:

Leishmaniose Visceral ou Calazar é uma doença crônica e freqüentemente fatal em crianças e adultos humanos jovens, se não tratada após o aparecimento dos sintomas: febre, caquexia, hepatosplenomegalia, hipergamaglobulinemia, anemia, pancitopenia, palidez, emagrecimento, pulso rápido, micropoliadenia, complicações respiratórias, hemorragias freqüentes e imunossupressão celular. O agente causal da doença, *Leishmania donovani*, desenvolve-se no interior de macrófagos e monócitos de baço, fígado, linfonodos e medula óssea, na forma amastigota.

## Prevenção

O tratamento da doença com quimioterápicos tem apresentado casos crescentes de resistência, que podem ser correlacionados tanto com resistência ao agente fármaco dos parasitas, quanto com o estado geral debilitado e a imunossupressão dos pacientes. Neste caso, a alternativa indicada é o tratamento a base de interleucinas, embora seja muito caro e ainda utilizado em carácter experimental. Concomitantemente, tem sido reportado o índice crescente de resistência aos inseticidas na população de mosquitos transmissores. Por todos estes fatores tem se registrado um aumento significativo de casos desta doença no Brasil e no mundo. No Brasil, surtos epidémicos recentes foram detectados, provavelmente devidos ao intenso desmatamento que leva à mudança do ecótipo do mosquito transmissor, das áreas florestadas às áreas domiciliares ou peridomiciliares .

A Organização Mundial da Saúde recomenda o desenvolvimento de estudos de vacinação com carácter urgente, na tentativa de controlar e erradicar esta doença. Para este fim se faz necessário proteger a população humana e a de canídeos, reservatórios potenciais na natureza.

No caso da Leishmaniose Tegumentar, os estudos de vacinação, inclusive com protocolos já aprovados para o uso em seres humanos, estão em fase avançada. Esta doença, mais branda que a Leishmaniose Visceral ou Calazar, é causada por espécies diferentes de *Leishmania*, com evolução, patologia e resposta imune diferente.

No caso da Leishmaniose Visceral, pelo contrario, poucos são os estudos de vacinação realizados até o presente. Estudos experimentais em camundongos indicam que o uso de parasitas mortos, na presença dos adjuvantes, reduz o nível de infecção. Recentemente, utilizando uma proteína purificada de *L. donovani*, a "dp72", Jaffe e colaboradores obtiveram 81% de protecção na infecção de fígado de camundongos medida em LDU "Leishman-Donovan Units" de Stauber: N<sup>o</sup> de amastigotas/1000 núcleos de células do órgão x peso do órgão em mg).

Comparando o modelo experimental do camundongo BALB/c ao do hamster na sua capacidade de reproduzir a Leishmaniose Visceral como se desenvolve em seres

## **P 1930333**

humanos, observa-se que o modelo do camundongo não é a melhor escolha, pelas seguintes razões:

- a infecção é branda, ocorrendo o pico de infecção no fígado com 15 a 30 dias após a infecção.

5 - a cura é espontânea após 30-50 dias.

- a infecção se desenvolve apenas no fígado, ou aparecendo apenas aos 45 dias no baço, não se detectando os parasitas na medula óssea.

- a infecção experimental não se mantém no camundongo, e a cada experimento, os amastigotas devem ser obtidos a partir de baços de hamsters infectados.

10 No nosso protocolo de vacinação com FML, utilizamos hamsters CB que desenvolvem, na dose infectante de  $1 \times 10^7$ , as seguintes manifestações:

- infecção grave, com o pico de infecção no baço e fígado ocorrendo entre os 45 e 60 dias após a infecção (Figura 6 e 7).

- se não tratados, os animais morrem por causa da doença, no quadro clínico

15 semelhante ao humano,

- a infecção é patente em baço, fígado e medula óssea e pode se manter por transferência de amastigotas obtidos do baço de hamsters infectados.

Por todas as razões citadas, no nosso estudo de vacinação utilizamos o hamster CB como modelo experimental, separando os grupos de machos e fêmeas, para poder evitar

20 possíveis diferenças devidas à variações hormonais.

A dose infectante de  $10^7$  amastigotas por via intracardíaca mostrou ser a mais adequada, determinando o aparecimento de parasitas em baço e fígado, entre 45 e 60 dias após a infecção (Figura 7) de maneira semelhante ao que acontece em seres humanos.

Observando o crescimento dos parasitas nestes órgãos foram definidos os tempos de 25 20, 40 e 60 dias como adequados para avaliação do efeito de vacinação (Figuras 8 - 11).

A vacina FML contra o Calazar, foi testada em diversos esquemas, p.ex.: 3 doses intraperitoneais semanais, 2 doses intraperitoneais seguidas de 3 endovenosas. A variação

## PROTEÇÃO

do título de anticorpos obtidos em vários esquemas de vacinação não foi significativo, de maneira que o esquema de 3 doses intraperitoneais foi escolhido como o mais eficiente, económico e simples na aplicação.

O antígeno FML para vacinação é veiculado em solução salina mercuriada, solução 5 de tinerosol 1:10000 em NaCl 0.95%, com PH 7.0 em frascos de vidro de volume 4 ml.

A vacina FML utilizada foi composta de solução salina estéril de NaCl 0,95%, contendo 500 mg de FML e 500 mg de saponina por ml. As soluções estoque de FML e saponina, ambos a 1 mg/ml em salina podem ser estocadas por meses em freezer a  $-20^{\circ}$  C. A vacina é aplicada em 3 doses intraperitoneais de FML (100 mg) e saponina (100 mg) em 10 0,2 ml de salina, com seringa de 1 ml e agulha intradérmica, uma dose por semana. A vacina FML experimentada em animais não causou até o presente nenhum efeito colateral indesejável.

A vacina FML contra o Calazar é capaz induzir proteção em hamsters CB, evidenciada nos animais vacinados e desafiados subsequentemente com  $10^7$  amastigotas por via 15 intracardiaca. Os parâmetros seguintes foram avaliados:

- Indução da resposta imune específica nos animais vacinados. O efeito da vacinação se detecta no aparecimento de intradermoreação positiva (Figura 8), anticorpos específicos anti-FML (Figura 9) e resposta proliferativa de esplenócitos de baço ao antígeno FML, ao lisado de promastigotas e ao lisado de amastigotas (Figura 10).
- 20 - Proteção nos animais vacinados e infectados experimentalmente: nestes o efeito de proteção foi observado a nível dos seguintes parâmetros:
  - Intradermoreação. IDR: a resposta se mantém positiva em machos e fêmeas, inclusive com 60 dias de infecção a diferença dos animais não vacinados nos quais se detecta imunossupressão e portanto a IDR é negativa (Figura 8).
  - 25 - Resposta proliferativa de esplenócitos de baço: ao antígeno de lisado de promastigotas. A proliferação é muito mais intensa nos animais vacinados do que nos controles, retardando a imunossupressão (Figura 10).

## Discussão

- Título de anticorpos anti-FML: no ELISA se observa um nível maior de anticorpos específicos anti-FML em todos os tempos, tanto em machos quanto em fêmeas (Figura 9). Os animais vacinados apresentam anticorpos específicos após a vacinação e antes de serem infectados experimentalmente.

5 - LDU de baço: concomitantemente com as outras variáveis, há uma diminuição do nível de infecção e atraso do aparecimento da mesma nos animais vacinados a respeito dos controles (Figura 11).

- LDU de fígado: também se detecta diminuição e atraso no aparecimento da infecção.

10 A análise estatística realizada pelo método de regressão múltipla, revelou uma alta significância,  $p < 0.01$ , sendo o efeito de proteção devido especificamente ao FML e não à contribuição do adjuvante saponina  $p < 0.01$ .

15 A aplicação da vacina FML, no modelo experimental atualmente utilizado, demonstra proteção em termos de relardo e diminuição da morbidade da doença, sem mostrar efeitos colaterais indesejáveis. A vacina FML é portanto um bom candidato para ser utilizada na vacinação dos reservatórios de Calazar na área endêmica. Cães e roedores são os principais reservatórios da moléstia, constituindo-se em fonte de infecção para os insetos transmissores flebótomos. Esses insetos infectam-se nos animais e transmitem a infecção aos seres humanos nos ambientes domiciliares ou peridomiciliares. A proteção destes animais redundará na proteção das comunidades humanas, também candidatas potenciais  
20 à vacinação com FML e/ou as suas SUBFRAÇÕES componentes, contribuindo no controle e erradicação da Leishmaniose Visceral Humana.



P 19302386

**EXEMPLOS:**

**Tabela (I) - REATIVIDADE DE SOROS DE PACIENTES COM CALAZAR, LEISHMANIOSE CUTÂNEA E MUCO-CUTÂNEA COM FML, EM TESTE DE ELISA (40 µg/ml).**

5 SOROS	TÍTULO ANTI-FML			
Leishmaniose Visceral	12400	6400	102400	25600
Leishmaniose Cutânea	400	200	400	200
Leishmaniose Muco-cutânea	400	-	-	-
Soro normal	200	200	200	200

P 19302388

**Tabela(II) TESTE DE ELISA QUALITATIVO E QUANTITATIVO USANDO FML (2.5 µg/ml) NO DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO E PROGNÓSTICO DO CALAZAR HUMANO. ANÁLISE DA SENSITIVIDADE E ESPECIFICIDADE.**

	Soro	No.Casos	Abs. 1/100 (SE)	Abs. 1/400 (SE)
5	Normal	8	0.133 (0.008)	0.049 (0.007)
	Leishmaniose Tegumentar	20	0.079 (0.016)	0.023 (0.005)
	Doença de Chagas	22	0.154 (0.018)	0.068 (0.007)
	Leishmaniose Visc. Curada	1	0.154	0.035
	Normal (area endemica)	45	0.120 (0.007)	0.032 (0.002)
10	Intermédio (area endemica)	21	0.202 (0.010)	0.066 (0.004)
	Reatividade alta (area endemica)	20	0.321 (0.025)	0.145 (0.028)
	Leishmaniose Visc. aguda	18	0.499 (0.079)	0.206 (0.039)

Potencial diagnóstico do FML no teste de micro-ELISA qualitativo.

	Soro	No.Caso	Titer (SE)	Score (SE)
		8		
15	Normal	8	1150 (338)	0.276 (0.021)
	Leishmaniose Tegumentar	20	710 (183)	0.168 (0.034)
	Doença de Chagas	22	1927 (239)	0.376 (0.044)
	Leishmaniose Visc. Curada	1	1600	0.312
	Normal (area endemica)	45	610 (111)	0.227 (0.014)
20	Intermédio (area endemica)	21	2906 (638)	0.457 (0.004)
	Reatividade alta (area endemica)	20	2760 (533)	0.907 (0.154)
	Leishmaniose Visc. aguda	18	22400 (10623)	1.638 (0.237)

Potencial diagnóstico do FML no teste de micro-ELISA quantitativo.

	TESTE	SENSITIVIDADE	ESPECIFICIDADE
25	Quantitativo	100 %	97 %
	Qualitativo 1/100	100 %	97 %
	Qualitativo 1/400	97 %	97 %

Análise da sensibilidade e especificidade no teste diagnóstico usando o FML.

P 19302388

**Tabela(III): LOCALIZAÇÃO DO FML (GP36) NA SUPERFÍCIE DE PRO- E AMASTIGOTAS DE *L. donovani* (LD1S Sudan) ATRAVÉS DE IMUNOFLORESCÊNCIA COM SORO HIPERIMUNE DE COELHO.**

	Soros	Parasitas vivos.		Parasitas fixados	
		PRO	AMA	PRO	AMA
5	Soro Anti-GP36 + Soro Fluoresceinado	102400	12800	8192	1024
	Sem soro	0	0	0	0
	Soro Fluoresceinado	10	10	10	10
	Soro de coelho preimmune + Soro Fluoresc.	400	400	32	16

**REIVINDICAÇÕES:**

1. Composições contendo frações de promastigotas ou amastigotas de *Leishmania*, denominado "Fucose Mannose Ligand" (FML), com uso potencial em imunodiagnóstico, imunoproteção ou imunoterapia em humanos ou animais, as frações sendo caracterizadas

5 pelas seguintes propriedades:

a) Compostos nativos, presentes em promastigotas e/ou amastigotas de *Leishmania*, solúveis em água, mostrando as bandas separadas em gel de poli-acrilamida na presença de SDS, sendo as principais de peso molecular aproximado de 94, 55, 43, 40, 36, 30, 23-  
25, 20, 17, 14 e 9 kD, contendo aproximadamente 28% de açúcares neutros, divididos em  
10 10% a fucose, 1% a xilose, 47% a manose, 12 % a galactose, 30% de glicose, e contendo: entre 20 e 10% de ácido glutâmico, alanina, ácido aspártico e glicina, entre 10 e 5% de serina, histidina, lisina, leucina, threonina, prolina e valina, e entre 5 e 2% de arginina, methionina, isoleucina, tirosina e fenilalanina.

b) Compostos nativos de aproximadamente 36 kD, mostrando a reação positiva com  
15 corantes para proteínas e carboidratos, contendo entre 20 e 10% de ácido glutâmico, glicina e serina, entre 10 e 5% de ácido aspártico, histidina, alanina, threonina e leucina, entre 5 e 2% valina e isoleucina, e reconhecidos pelos soro hiperimunes de coelhos, camundongos, e hamsters e soro de animais e humanos infectados por *Leishmania*, induzindo proliferação de linfócitos de animais e humanos infectados por *Leishmania*.

20 c) Compostos nativos de aproximadamente 55 kD, mostrando a reação positiva com corantes para proteínas e carboidratos, contendo entre 30 e 10% de ácido glutâmico, glicina, ácido aspártico e alanina, entre 10 e 3% de threonina e serina, e reconhecidos

## P 19302305

pelos soros hiperimunes de camundongos e hamsters e soros de animais e humanos infectados por *Leishmania*.

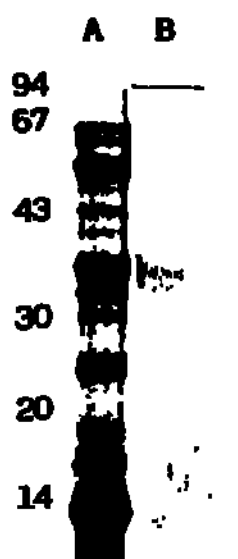
2. Uso das composições contendo frações definidas na reivindicação 1., na sua totalidade ou qualquer das suas subfrações, adicionadas ou não de veículos farmacológicos adequados, para preparação de reagentes usados em imunodiagnóstico ou acompanhamento de tratamento da Leishmaniose em humanos ou animais.

3. Uso das composições contendo frações definidas na reivindicação 1., na sua totalidade ou qualquer das suas subfrações, adicionadas ou não de veículos farmacológicos adequados, para preparação de reagentes usados em vacinação ou qualquer outro tratamento visando a imunoproteção da Leishmaniose em animais ou humanos.

4. Uso das composições contendo frações definidas na reivindicação 1., na sua totalidade ou qualquer das suas subfrações, adicionadas ou não de veículos farmacológicos adequados, para preparação de reagentes usados em vacinação ou qualquer outro tratamento visando a imunoterapia da Leishmaniose em animais ou humanos.

P 19302386

FIGURAS

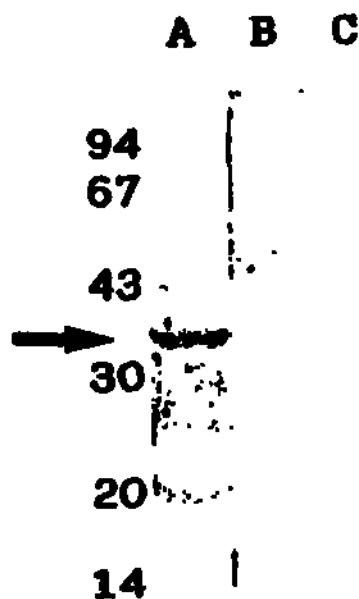


**Figura 1 FML E A ELUIÇÃO QUÍMICA DA GP36.**

**A = 150 µg de FML corado por Coomassie Blue R**

**B = GP36 eluída com 1% de SDS em 1% de carbonato de sódio**

P19302308



**Figure 2: DETECÇÃO DA GLICOPROTEÍNA GP38 COMO ANTÍGENO PRINCIPAL DO FML ATRAVÉS DO MÉTODO DE WESTERN BLOTING, USANDO SORO HIPERIMUNE DE COELHO**

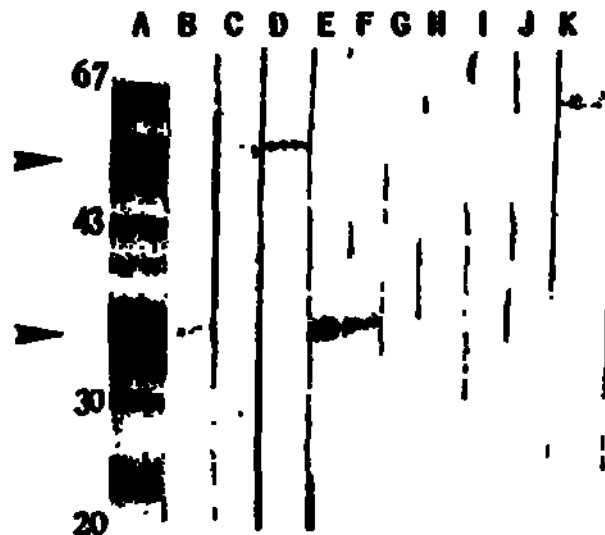
P 19302388



**Figura 3 DETECÇÃO DA GLICOPROTEÍNA GP36 DO FML NA SUPERFÍCIE DE PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *L. donovani* (LD 1S Sudan) ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.**



P 19302385



**Figure 4. ANÁLISE DA REATIVIDADE DO FML COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ATRAVÉS DO MÉTODO DE WESTERN BLOTTING:**

**A** 150 µg FML corado com Coomassie Blue

**B** 30 µg FML + anticorpo monoclonal AC2E10 (IgG), reconhecendo GP38

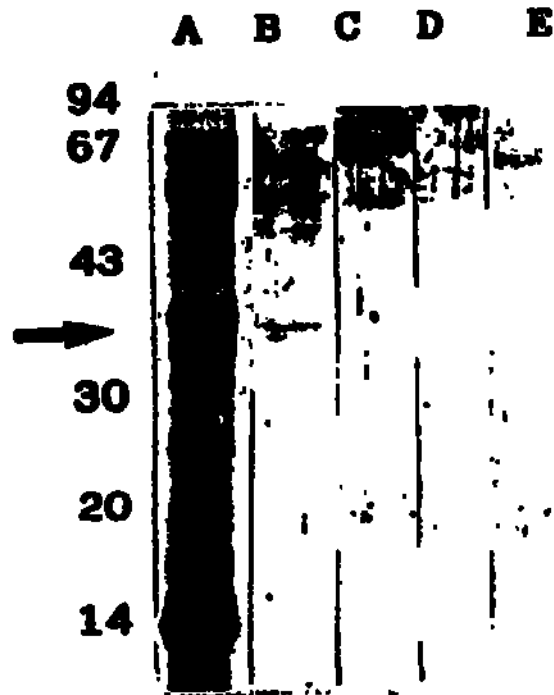
**C:** 30 µg FML + anticorpo monoclonal CA2A9 (IgG), reconhecendo a banda de 55 kD

**D** 30 µg FML + anticorpo monoclonal AC2D4 (IgM), reconhecendo a banda de 55 kD.

**E - J.** 30 µg FML + CA2D4 (IgG). Nos F - J, o aligero foi pretreatado com peirodato de sódio nas concentrações de 0.1, 1, 5, 10 e 20 mM, respectivamente.

**K.** 30 µg GP63 de *L. major*

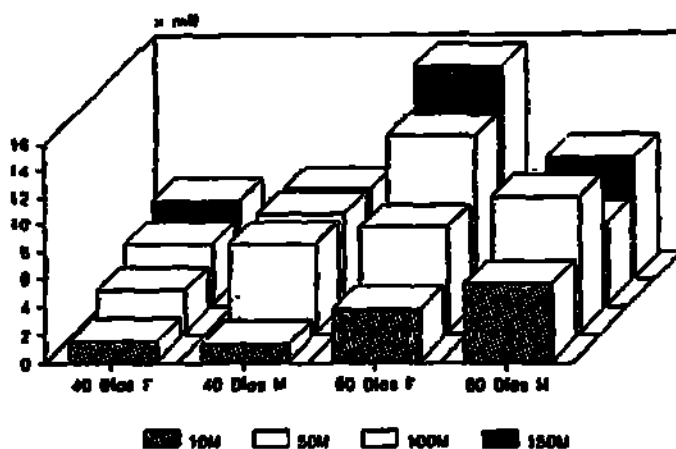
P 19302386



**Figura 5: IMUNODIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA COM FML PELO MÉTODO DO WESTERN BLOTING**

- A. 150 µg FML corados com Coomassie Blue
  - B. 30 µg FML com soro de Leishmaniose Visceral (1:100)
  - C. 30 µg FML com soro de Leishmaniose Muco-Cutânea (1:50)
  - D. 30 µg FML com soro humano normal (1:100)
  - E. 30 µg FML de GP63 de *Leishmania major*.
- A seta indica a posição da GP36.

# LDU - fígado



# LDU - baço

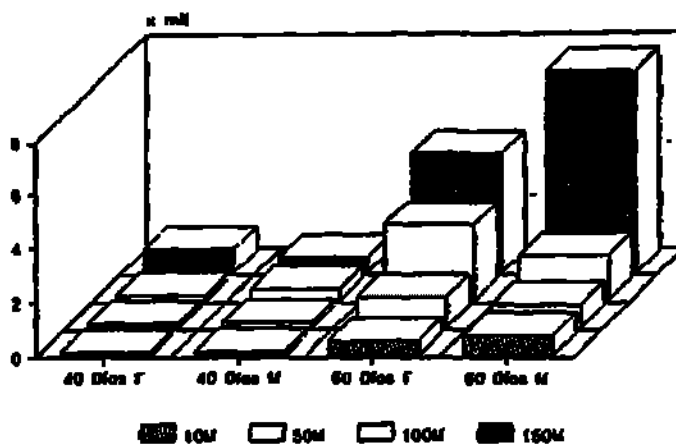
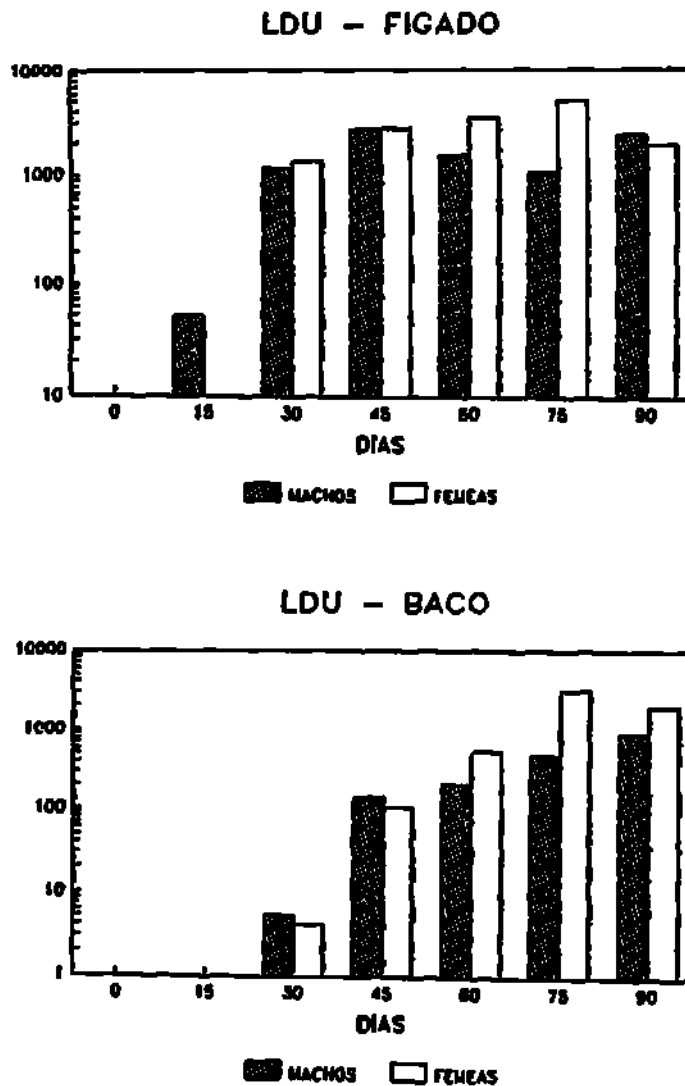


Figura 6a EVOLUÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO FÍGADO DE HAMSTERS INFECTADOS COM *L. donovani* (LD 1S) Sudan : EFEITO DE QUANTIDADE CRESCENTE DE PARASITAS.

Figura 6b EVOLUÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BAÇO DE HAMSTERS INFECTADOS COM *L. donovani* (LD 1S) Sudan) : EFEITO DE QUANTIDADE CRESCENTE DE PARASITAS.

Valores de "Leishman-Donovan (Units" em hamsters CB, machos e fêmeas, após inoculação intracardíaca de  $10^7$  (10M) e  $15 \times 10^7$  (150M) amastigotas

P 19302386

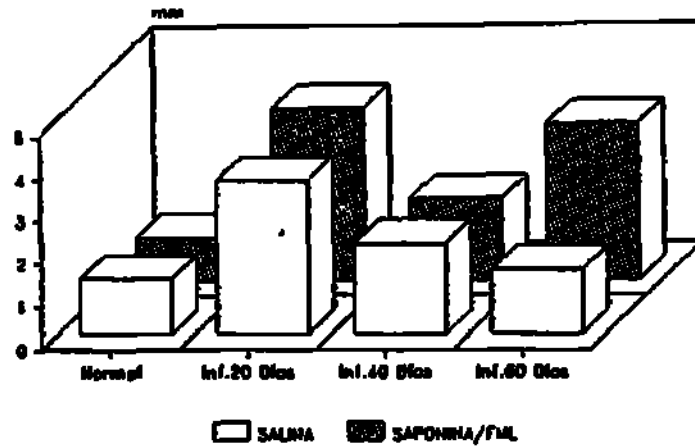


**Figure 7a: EVOLUÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO FÍGADO DE HAMSTERS INFECTADOS COM  $10^7$  amastigotes de *Leishmania donovani* (LD 1S) Sudan . EFEITO DO TEMPO.**

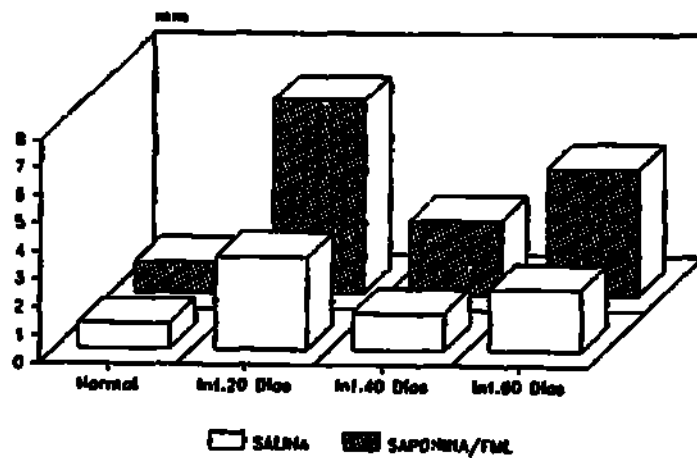
**Figure 7b: EVOLUÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BAÇO DE HAMSTERS INFECTADOS COM  $10^7$  amastigotes de *Leishmania donovani* (LD 1S) Sudan . EFEITO DO TEMPO.**

P19302386

### IDR - Machos



### IDR - Fêmeas



**Figura 8 INTRADERMO-REACÇÃO EM HAMSTERS (24 h), A = MACHOS, B = FÊMEAS INDUZIDA PELA INOCULAÇÃO DO LISADO DE  $10^7$  PROMASTIGOTAS DE *L. donovani* (LD 1S Sudan), VACINADOS COM FML E SAPONINA**

P 19302388

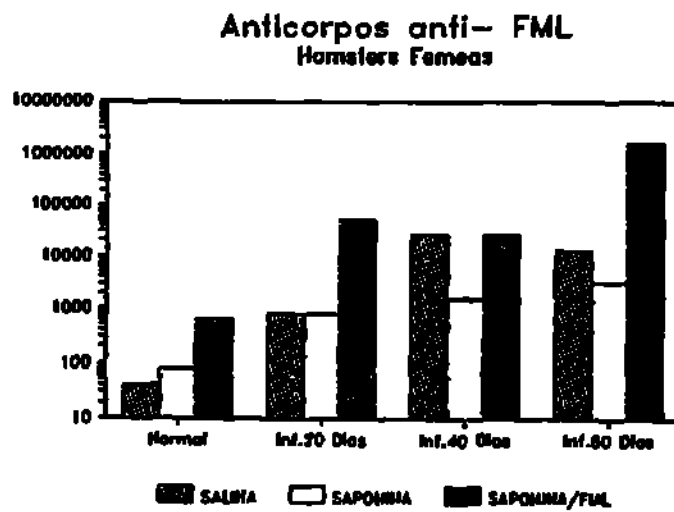
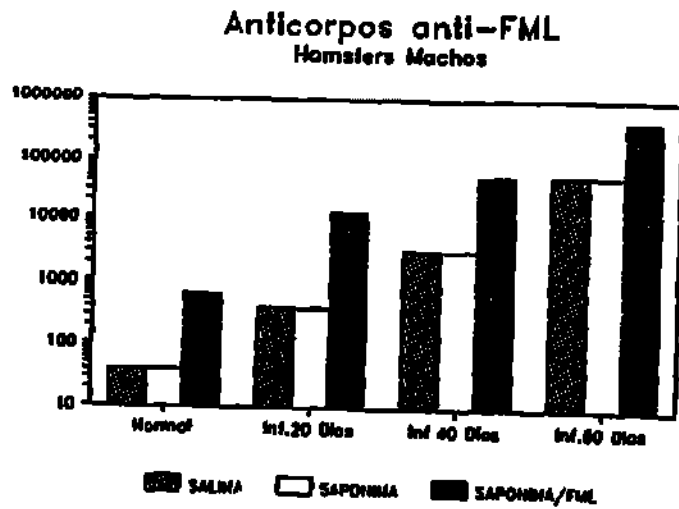
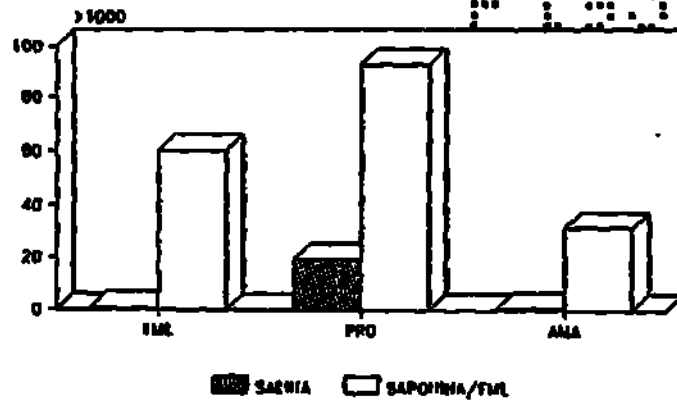
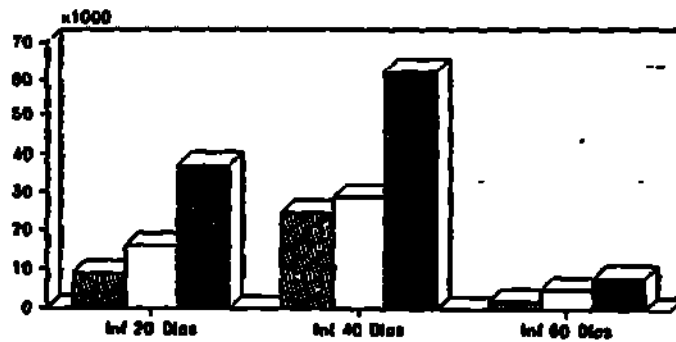


Figura 9 TÍTULO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-FML EM HAMSTERS VACINADOS COM FML/SAPONINA, ANTES E APÓS A INFECÇÃO COM *L. donovani* (LD 1S) Sudan. - A = MACHOS, B = FÊMEAS.

Proliferaçao de esplenocitos em resposta  
ao FML ou liçado de pro- ou amastigotas.  
Hamsters sensibilizados com FML



Proliferaçao de esplenocitos em resposta  
ao FML - hamsters machos infectados  
com *L.donovani*



Proliferaçao de esplenocitos em resposta  
ao FML - hamsters femeas infectadas  
com *L.donovani*

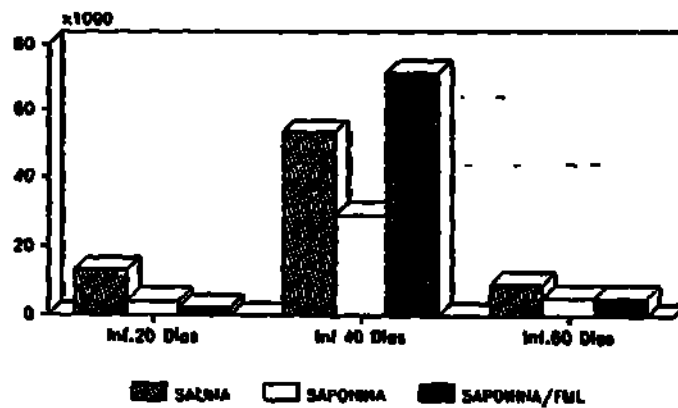


Figura 10 PROLIFERAÇÃO DE ESLENÓCITOS DE BAÇO DE HAMSTERS VACINADOS COM FML, ANTES (A) E APÓS (B - MACHOS, C - FÊMEAS) A INFECÇÃO COM *L. donovani* (LD 1S) Sudan

P 19302085

#### **RESUMO**

**Patente de invenção: "Composições contendo frações nativas de células de *Leishmania*, denominadas antígeno FML "Ligante de Fucoose Mancee", e do uso deste antígeno FML e de suas subfrações e componentes: glicoproteínas de 36, 55 Kd, e outras proteínas, 5 adicionadas ou não de veículos farmacológicos, para as aplicações em imunodiagnóstico específico da leishmaniose visceral humana e animal, e para as aplicações em vacinação, tratamento ou imunoterapia contra a leishmaniose visceral humana e canina. "**