



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

(11) (21) **PI 0500726-7 A**



(22) Data de Depósito: 28/02/2005
(43) Data de Publicação: 17/10/2006
(RPI 1867)

(51) Int. Cl⁷ .:
A61K 39/008

(54) Título: COMPOSIÇÕES VACINAIS CONTRA LEISHMANIOSE E USOS

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

(72) Inventor(es): Bartira Rossi Bergmann, Eduardo Fonseca Pinto, Alice Rayol Ramos Sandes

(74) Procurador: Bernardo Atem Francischetti

(57) Resumo: "COMPOSIÇÕES VACINAIS CONTRA LEISHMANIOSE E USOS". A presente invenção pertence ao campo das composições de vacinas. Mais especificamente a presente invenção relaciona-se a composições de vacinas para serem administradas por vias de mucosa, incluindo preferencialmente a mucosa oral e nasal. Adicionalmente, a presente invenção abrange ainda o uso das referidas composições.

Relatório Descritivo

COMPOSIÇÕES VACINAIS CONTRA LEISHMANIOSE E USOS

5 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à composições de vacinas contra leishmaniose. Mais especificamente a presente invenção refere-se preferivelmente à composições de vacinas eficazes quando administradas pelas vias de mucosa.

10

Antecedentes da Invenção

Leishmaniose - A Doença

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida), que são parasitos intracelulares do homem e de outros vertebrados. Após a penetração no hospedeiro através da picada da fêmea do flebotomíneo da subfamília Phlebotominae (gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo) infectada, os parasitos na forma promastigota metacíclica são fagocitados por macrófagos da pele e se diferenciam no fagolisosomo em amastigotas, se multiplicam e promovem a lise dos macrófagos sendo liberados e fagocitados por outros macrófagos. (Russel & Talamas-Rohana, 1991).

Clinicamente, as leishmanioses podem ser divididas em dois grandes grupos: visceral e tegumentar. A leishmaniose visceral ou calazar é a doença mais grave, causada por espécies viscerotrópicas (*L.(L.) donovani* e *L.(L.) chagasi* / *L.(L.) infantum*) que parasitam macrófagos do fígado, baço e medula óssea. É caracterizada por hepatoesplenomegalia, febre, caquexia, anemia e imunossupressão da resposta celular que pode levar à superinfecção e morte na ausência de tratamento. A leishmaniose tegumentar pode ser causada por várias espécies diferentes de *Leishmania*, assumindo diversas formas clínicas determinadas pela espécie do parasito e pela resposta imune do hospedeiro

(Silveira *et al.*, 2004). No Brasil, a leishmaniose tegumentar é principalmente causada por três espécies de *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (Coutinho *et al.*, 1987). Essas espécies são capazes de produzir a forma clínica mais freqüente da doença, a leishmaniose cutânea localizada (LCL), que é caracterizada por lesões simples ou múltiplas localizadas. A lesão, geralmente indolor, desenvolve-se em úlcera cutânea com borda elevada e fundo granuloso limpo ou com pouca secreção, em moldura, acompanhada ou não de linfadenopatia local (Herwaldt, 1999). A LCL apresenta boa resposta ao tratamento com antimoniais e pode também evoluir para cura espontânea em até 50% dos casos (Grevelink & Lerner, 1996). Dependendo da espécie e da resposta imune do hospedeiro, a LCL pode evoluir para outras formas clínicas: a leishmaniose mucocutânea (LMC) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD). A LMC é associada à *L. braziliensis* na maioria dos casos e esta forma da doença também se inicia com uma simples úlcera na pele que pode curar após um curto período de tratamento, mas em alguns meses ou anos, novas lesões podem aparecer na mucosa nasal e progressivamente destruir os tecidos do nariz e da boca. Esta forma mucocutânea é caracterizada por baixo número de parasitos no local e alta resposta imune celular. A LCD é a forma anérgica da leishmaniose tegumentar. No Brasil, está associada principalmente à *L. amazonensis* (Lainson, 1983) e é caracterizada por lesões múltiplas não ulceradas contendo alto número de parasitos e baixa ou inexistente resposta imune celular. A resposta à terapêutica na LCD é mais difícil que nas outras formas clínicas e as recidivas são frequentes.

A leishmaniose é endêmica em diversas partes do mundo com uma população de risco estimada em 350 milhões de pessoas, com incidência de 2 milhões de novos casos por ano e uma prevalência de 12 milhões de pessoas (WHO, 1995). Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral no mundo ocorrem na Índia, Sudão, Brasil e Bangladesh. Já os casos de leishmaniose cutânea são encontrados principalmente no Irã, Arábia Saudita, Brasil, Peru e Afeganistão (WHO, 1995). No Brasil, são observadas situações

epidemiológicas distintas: uma, de doença ligada a florestas, aumentando sua incidência após desmatamento, com vetores e reservatórios silvestres, sendo considerada uma doença ocupacional com maior incidência em adultos do sexo masculino que trabalham na área de risco. Esta é a situação epidemiológica atualmente predominante na Amazônia. A outra é relacionada à transmissão domiciliar e peri-domiciliar por espécies de vetores adaptados ao ambiente modificado pelo homem e reservatórios representados por animais domésticos, principalmente cães. Neste caso, a incidência é equivalente nos dois sexos, em todas as faixas etárias e é característica da situação atual na região Sudeste.

Tratamento

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) os antimoniais pentavalentes, utilizados na clínica médica há 60 anos, são os fármacos de primeira escolha para tratamento da leishmaniose. Entre eles estão o estibogluconato de sódio (Pentostam) e o antimoniato de meglumina (Glucantime). O esquema de tratamento recomendado pela OMS em 1984 para o calazar, é de 20 mg de Sb/Kg.dia/im ou iv, com a dose máxima diária de 850 mg de Sb por, no mínimo, 20 dias e até 2 semanas após a negatividade sorológica. Para a leishmaniose cutânea, a recomendação é de 10-20 mg de Sb/Kg.dia por 20 dias seguidos, caso não haja melhora da ferida 3 meses após o término do tratamento, o mesmo deverá ser repetido por igual período (20 dias), apenas uma vez. Para a mucocutânea, o tratamento é de 20 mg de Sb/Kg.dia durante 30 dias, com repetição do tratamento por igual período caso não haja melhora da ferida 3 meses após o o tratamento inicial. A eficácia terapêutica é geralmente alta se este regime é adotado, no entanto este tratamento apresenta uma série de inconvenientes:

- a terapia é longa e requer monitoramento em centros de atendimento médico, o que aumenta a evasão ao tratamento e o custo (Walton, 1987);
- embora muitas falhas possam ser atribuídas às reinfecções ou às variabilidades individuais (farmacocinéticas ou imunológicas), a resistência aos

antimoniais em algumas áreas endêmicas tem sido reportada (Lira *et al.*, 1999);

- o tratamento é quase invariavelmente acompanhado de efeitos colaterais incluindo cardiotoxicidade e hepatotoxicidade (Berman, 1988; Hepburn *et al.*, 1994).

Em pacientes com problemas cardíacos ou que não respondem aos antimoniais, o tratamento de segunda escolha é a Anfotericina B que é administrada através de infusão endovenosa, produz febre, calafrio e dor nas articulações, além de severa nefrotoxicidade (Berman, 1997). A necessidade de desenvolver formulações menos tóxicas de anfotericina B levou a três novas formulações: a anfotericina B lipossomal (AmBisome), a dispersão coloidal de anfotericina B (Amphocil) e o complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet). De uma maneira geral, essas formulações são bem captadas pelo sistema reticuloendotelial, onde os parasitos residem e são fracamente captadas pelos rins, o principal alvo de toxicidade orgânica.

O principal avanço no tratamento da leishmaniose nos últimos anos ocorreu com a descoberta do efeito terapêutico da Miltefosina. Trata-se de uma fosfocolina administrada por via oral, desenvolvida inicialmente para o tratamento do câncer. Porém, a toxicidade nas doses terapêuticas necessárias para combater essa doença limitou os testes clínicos para o câncer. Por outro lado, a Miltefosina mostrou atividade contra *Leishmania donovani* e foi licenciada pelo governo indiano em março de 2002 (Davies *et al.*, 2003). Embora a Miltefosina represente um marco na luta contra a leishmaniose, sendo o primeiro medicamento de administração oral, ela produz efeitos desagradáveis na maioria dos pacientes tratados. Levantamentos feitos durante os estudos clínicos revelaram que 60% dos pacientes relataram sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômito e diarreia (Jha *et al.*, 1999) e seu efeito sobre *L. amazonensis* ainda não foi avaliado. Estudos recentes na Índia indicam uma melhora na tolerância à miltefosina em crianças e adultos com leishmaniose visceral (Bhattacharya *et al.*, 2004).

Aspectos Imunológicos da Leishmaniose

A leishmaniose cutânea murina é um modelo para a doença humana que é de grande importância, não só pela estreita correlação com a doença humana, mas também por ser um modelo interessante para o estudo de diversos aspectos da resposta imune celular.

5 Os linfócitos T CD4⁺ murinos, através do padrão de citocinas secretado, podem ser classificados em pelo menos duas subpopulações: T “helper” 1 (Th1), que produz IFN- γ e Th2 que produz IL-4, IL-5 e IL-10 (Mosmann & Coffman, 1989). Em modelos murinos de leishmaniose cutânea causada por *L. major*, linhagens de células protetoras apresentam propriedades Th1 e
10 linhagens de células exacerbantes apresentam propriedades Th2, com diferentes efeitos no resultado da infecção. O balanço entre esses dois subgrupos resulta na maior susceptibilidade ou resistência na leishmaniose experimental (Scott *et al.*, 1988). Diferentes cepas de camundongos possuem graus variados de susceptibilidade a uma determinada espécie de *Leishmania*
15 (Modabber, 1989). Por exemplo, camundongos BALB/c são altamente susceptíveis à infecção com *L. major* e *L. amazonensis*, enquanto outras cepas, como C57BL/6, C3H, CBA, entre outras exibem variados graus de resistência à doença.

Camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major* apresentam
20 uma forte correlação entre susceptibilidade e desenvolvimento de lesões e uma resposta imune tipo Th2. Essa resposta aberrante está correlacionada com a rápida produção de IL-4 por células T CD4⁺ V β 4 V α 8 (Launois *et al.*, 1997). Essa peculiaridade dos camundongos BALB/c é devida à proliferação desses linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 responsivos à proteína LACK
25 (Homóloga de *Leishmania* de Receptores de Proteína Quinase C Ativada) presente em bactérias da flora intestinal destes camundongos e que também está presente nas diferentes espécies e formas de *Leishmania*. Gera-se, então, uma reação cruzada destes linfócitos de memória com a *Leishmania*, resultando na forte e precoce produção da citocina IL-4 (Julia *et al.*, 2000).
30 Essa produção precoce de IL-4 é precedida pela rápida expressão de transcritos de RNA mensageiro (mRNA) para IL-4 nos linfonodos de

camundongos BALB/c 16 horas após infecção subcutânea com *L. major* (Launois *et al.*, 1999). Como a susceptibilidade de mamíferos a patógenos intracelulares é determinada durante a transição inicial da imunidade inata para a específica (Fearon & Locksley, 1996), esses camundongos adquirem esse

5 fenótipo característico de susceptibilidade. Por outro lado, a IL-4 nem sempre está associada à expansão de células Th2. IL-4 presente em concentrações locais relativamente altas e durante a ativação inicial de células dendríticas pode levar ao fenótipo de resistência em camundongos normalmente

10 susceptíveis à *L. major* por levar à diferenciação dessas células em células dendríticas produtoras de IL-12, citocina importante na diferenciação de linfócitos virgens em linfócitos Th1 (Biedermann *et al.*, 2001). Os macrófagos possuem uma função central na leishmaniose, onde são importantes não só como células hospedeiras dos parasitos, mas também como células

15 apresentadoras de antígenos estimulando células T específicas, (Solbach *et al.*, 1991; Sunderkötter *et al.*, 1993). As citocinas liberadas pelas células T ativadas, por sua vez, regulam positivamente (ex: IFN- γ) ou negativamente (ex: IL-4, IL-10 e IL-13) a atividade microbicida dos macrófagos (Zurawski & Vries, 1994) que são as células efetoras finais, responsáveis pela eliminação dos parasitos.

20 A ativação dos macrófagos desencadeia a produção de óxido nítrico (NO), que junto com o estresse oxidativo é um importante mecanismo na destruição dos parasitos intracelulares (Liew *et al.*, 1990 e 1991; Stenger *et al.*, 1994). A IL-10, apesar de ser uma citocina inibidora de mecanismos microbicidas dos macrófagos, não é uma mediadora dominante na susceptibilidade de BALB/c à

25 infecção por *L. mexicana* ou *L. amazonensis*, mas tem papel importante na regulação do desenvolvimento de resposta Th1 protetora e, se neutralizada juntamente com a IL-4, leva a uma resolução efetiva da doença (Padigel *et al.*, 2003). Por outro lado, sua elevada produção no início da infecção se acompanhada da inibição da produção de IFN- γ pode contribuir para que a

30 resposta seja direcionada para o tipo Th2 em camundongos BALB/c infectados com *L. major* (Chatelain *et al.*, 1999).

O papel das células CD8⁺ na infecção murina já foi sugerido em vários trabalhos (Muller *et al.*, 1991; Conceição-Silva *et al.*, 1994). Foi demonstrado por Titus *et al.* em 1987, que a depleção destas células durante o curso da lesão, leva à exacerbação da doença tanto em camundongos susceptíveis quanto em
5 camundongos resistentes. Em animais relativamente resistentes (C57BL/6) infectados com *L. amazonensis*, a depleção das células CD8⁺ levou à redução de 77% do IFN- γ . No entanto, quando foram depletadas as células CD4⁺ a produção de IFN- γ foi praticamente nula (Chan, 1993). Estes dados sugerem que ambas as células, CD4⁺ (Th1) e CD8⁺ (Tc1), são importantes na produção
10 de IFN- γ e na cura da doença nos animais resistentes.

A presença de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ tem papel fundamental no controle da resposta contra a *Leishmania*, podendo levar à persistência do parasito por tempo prolongado associada à resistência à re-infecção (Belkaid *et al.*, 2002). Em camundongos susceptíveis, essas células suprimem a
15 resposta Th2 exacerbada, enquanto que, em camundongos resistentes, elas controlam a resposta Th1, permitindo a sobrevivência do parasito e a manutenção da memória imunológica (Aseffa *et al.*, 2002; Belkaid, 2003).

Leishmaniose humana

No homem a dicotomia das células CD4⁺ em células Th1 e Th2 não está
20 completamente estabelecida. Entretanto existem evidências de que células T CD4⁺ humanas têm padrão de citocinas e funções que são comparáveis às células Th1 e Th2 de camundongos (Kharazmi *et al.*, 1999), inclusive em resposta a antígenos de *L. major* e *L. donovani* (Kemp *et al.*, 1998; Kurtzhals *et al.*, 1994). Como nos camundongos, em humanos o espectro de citocinas
25 típicas de células Th1 é geralmente induzido em resposta a uma série de patógenos intracelulares (Yamamura *et al.*, 1991), enquanto que as citocinas de células Th2 são induzidas em resposta às doenças alérgicas e às infecções por helmintos (Limaye *et al.*, 1990; Maggi *et al.*, 1992).

Pacientes com a forma mais benigna da leishmaniose, a cutânea
30 localizada, tendem a ter altos níveis de IFN- γ , enquanto que pacientes com a forma cutânea difusa tendem a ter altos níveis de IL-4 (Kemp *et al.*, 1996).

Pacientes com leishmaniose mucocutânea também apresentaram altos níveis de IFN- γ (Bacellar *et al*, 2002). O curso da leishmaniose em humanos, como em camundongos, depende do balanço Th1/Th2, mas a mútua inibição não é tão marcante como é no modelo murino de infecção com *L. major* (Kemp *et al*,
5 1996).

O aumento da proporção de células T CD8⁺ sobre T CD4⁺ em pacientes com leishmaniose cutânea após o sucesso do tratamento com antimonial (Da-Cruz *et al.*, 1994) sugere que as células T CD8⁺ humanas têm uma participação na resposta imune protetora contra a leishmaniose.

10 Vacinação na Leishmaniose

Como já comentado, a quimioterapia na leishmaniose ainda apresenta vários problemas. O controle dos insetos vetores pelo uso de inseticidas, mesmo sendo eficaz no domicílio e peri-domicílio, não é viável em larga escala por motivos ecológicos e econômicos (Young & Arias 1991). O controle do
15 hospedeiro reservatório é difícil, pois alguns são silvestres (Ministério da Saúde, 1994). Por todos estes motivos, o desenvolvimento de vacinas preventivas contra a leishmaniose é altamente desejável. Este objetivo tem sido perseguido há várias décadas, mas até hoje não há uma vacina aprovada para uso clínico.

20 De uma forma geral, as vacinas podem ser classificadas em vacinas de primeira, segunda e terceira geração. As vacinas de primeira geração, as mais antigas, são compostas de microorganismos mortos ou atenuados, ou ainda de misturas não caracterizadas de antígenos. Na leishmaniose, até mesmo parasitos infectantes vivos já foram e ainda são utilizados, como no caso da
25 leishmanização no Oriente Médio, onde promastigotas de *L. major* são injetados em locais do corpo normalmente não expostos a fim de evitar o estabelecimento da infecção em áreas expostas como a face. Uma vacina de 1^a geração bastante estudada em humanos é a Leishvacin®, uma vacina polivalente, contendo lisado de promastigotas de várias espécies (*L. major*, *L.*
30 *guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*). A Leishvacin® foi desenvolvida no Brasil pelo grupo do Dr. Wilson Mayrink e produzida a partir de 1991 pela

BioBrás em Montes Claros (MG) mas sua produção industrial foi recentemente descontinuada. Foram efetuados estágios clínicos de Fase I, atestando sua segurança (Marzochi *et al.*, 1998) e de fase II, atestando sua imunogenicidade (de Luca *et al.*, 1999), mas sua eficácia ainda não foi estabelecida e está em testes clínicos no Brasil, Colômbia e Equador (OMS, 2001). Além disso, é possível que a imunogenicidade do próprio teste de Montenegro (de Luca *et al.*, 2003) possa ter interferido na avaliação da eficácia da vacina (Antunes *et al.*, 1986). Surpreendentemente, a versão simplificada da vacina polivalente (composta somente por *L. amazonensis*), administrada por via s.c. em macacos, exacerbou a infecção subsequente com *L. amazonensis*, só mostrando alguma proteção quando administrada junto com IL-12 e alúmen (Kenney *et al.*, 1999). No entanto, esta versão univalente da vacina tem apresentado bons resultados como imunoterápico quando associada a antimoniais pentavalentes (Machado-Pinto *et al.*, 2002).

As vacinas de segunda geração, ainda em fase experimental, podem ser divididas em 3 categorias de acordo com a sua composição: vacinas vivas geneticamente modificadas, subunidades definidas e frações brutas. Vacinas vivas incluem promastigotas de *Leishmania* geneticamente modificadas que causariam uma infecção abortiva, como um clone de *L. major* do qual foi removido o gene para a proteína diidrofolato redutase/timidilato sintetase (Cruz *et al.*, 1991), que induziu proteção parcial em camundongos BALB/c contra infecção por *L. major* (Titus *et al.*, 1995). Entre as vacinas com subunidades definidas, além do antígeno gp63 que tem sido estudado mais extensivamente (Russo *et al.*, 1991), tem-se ainda o LelF, análogo recombinante da proteína ribossomal eucariótica (Sheiky *et al.*, 1994). Entre as frações brutas, o FML, ligante de fucose e manose de *L. donovani* induziu proteção na infecção por *L. donovani*, levando à redução da carga parasitária e de sinais clínicos da doença em camundongos (Santos *et al.*, 2002 e 2003) e em cães (Borja-Cabrera *et al.*, 2002 e 2004) e está atualmente sendo produzida industrialmente para aplicação veterinária contra o calazar.

As vacinas de terceira geração são as chamadas vacinas gênicas, onde genes que codificam antígenos potencialmente imunizantes, são carregados por plasmídeos. Em fase experimental estão alguns estudos, como: LACK-DNA administrado por via s.c. que protegeu camundongos BALB/c contra *L. major* (Gurunathan *et al.*, 1997), P4/IL-12 DNA administrado por via i.m. que protegeu camundongos BALB/c contra *L. amazonensis* (Campbell *et al.*, 2003), o coquetel de DNA codificando LACK, LmST11 and TSA por via i.d., i.m. e s.c. que protegeu camundongos C57Bl/6 contra *L. major* (Mendez *et al.*, 2002). Uma característica importante dos plasmídeos é a presença de seqüências nucleotídicas específicas que têm papel crítico na imunogenicidade das vacinas: as seqüências Citosina-fosfato-Guanosina Oligodeoxinucleotídeo (CpG ODN) flanqueadas por regiões compostas de duas purinas em 5' e duas pirimidinas em 3' (Gurunathan *et al.*, 2000). Tais seqüências são normalmente não metiladas no plasmídeo, ao contrário das mesmas nas células eucariotas, e são 16 a 20 vezes mais comuns em bactérias se comparados com mamíferos. Elas se ligam ao Receptor Tipo Toll - 9 (TLR-9) presente em macrófagos e em células dendríticas (Medzhitov, 2001) o que permite que elas ajam como importantes adjuvantes nos processos de vacinação que visam o direcionamento de resposta Th2 para Th1, pois elas induzem a produção de IFN- γ e IL-12 e o decréscimo de produção de IL-5 (Klinman *et al.*, 1996). Também incluída nesta categoria estão as bactérias e os vírus recombinantes, que carregam antígenos de *Leishmania* que têm sido testados em modelos animais. Este é o caso do gene da protease de superfície gp63 de *L. major* expresso em *Salmonella typhimurium* e do vírus vaccinia expressando o gene de gp46/M-2 de *L. amazonensis* (Yang *et al.*, 1990 e McMahon-Pratt., 1993).

A abordagem empírica usada nas vacinas de primeira geração (parasitos mortos) tem fornecido um grande número de informações sobre a reatividade de humanos à vacina. De fato, só esses tipos de vacinas até agora atingiram níveis de estudos detalhados de segurança, eficácia e testes clínicos em humanos (OMS, 2001).

Contudo, um caminho diferente para a geração de imunidade protetora usando vacinas tolerogênicas pode ser vislumbrado, onde o silenciamento de uma população deletéria é suficiente para permitir que o resto do sistema imune funcione de maneira protetora. De fato, foi demonstrado também que a tolerização das células T parasito-específicas pode também ser induzida na periferia após administração nasal de 12 μ g de Ag LACK de *L. major* conjugado à subunidade β da toxina colérica (CTB) (McSorley *et al.*, 1998). Este tratamento retardou o crescimento da lesão nos camundongos infectados e foi associado com a diminuição da resposta proliferativa ao LACK. O mais importante é que este tratamento reduziu em quase 1000 vezes a carga parasitária na pele e nos linfonodos drenantes do animal infectado. Tentativas do mesmo grupo em induzir proteção por tolerância oral com LACK não tiveram sucesso, uma vez que uma dose de 8 mg de LACK recombinante sem adjuvante não alterou o curso da infecção com *L. major*.

15 Sistema Imune Associado às Mucosas

A maioria dos antígenos ganha acesso ao corpo através de uma superfície mucosa como o trato gastrointestinal ou respiratório. Com isso, as mucosas têm associado um sistema imunológico grande e complexo, anatômica e funcionalmente distinto daqueles encontrados em outras regiões do corpo no que se refere a processos especializados para captação de antígenos, transporte, processamento e apresentação dos mesmos, assim como em relação aos mecanismos imunes efetores especializados, como a produção de IgA secretória.

O sistema imune das mucosas compreende os elementos linfóides associados com uma superfície interna do corpo, como o trato gastrointestinal (GI), tratos respiratórios inferior e superior, e trato urogenital. Neste estudo iremos nos concentrar na imunidade da mucosa intestinal e nasal, uma área que tem recebido maior atenção dos imunologistas e tem possibilitado significativas descobertas.

30 a) Tecido linfóide associado à mucosa intestinal

O tecido linfóide associado ao intestino (GALT em inglês) é composto de: placas de Peyer (PP), linfonodos mesentéricos (MLN), e um grande número de células linfóides espalhadas pela lâmina própria e epitélio intestinal.

As PP têm a aparência anatômica de um órgão linfóide secundário
5 clássico, com áreas de células B e T claramente definidas. Elas estão na submucosa separadas do lúmen intestinal por uma única camada de células epiteliais cúbicas, o epitélio associado ao folículo (FAE). Além dos enterócitos convencionais, esta camada epitelial contém células linfóides de todos os tipos, assim como uma população de células epiteliais especializadas (células
10 M), cuja função parece ser a captação e o transporte de antígenos nos tecidos linfóides. As PP são os principais sítios para o *priming* de células T e B no intestino e acredita-se que para indução de imunidade ativa no intestino, antígenos do lúmen devem ganhar acesso ao GALT via células M no epitélio das PP. Ao contrário dos enterócitos, células M não têm microvilosidades, mas
15 são cobertas por reentrâncias nas quais os microorganismos e materiais particulados podem se ligar preferencialmente, promovendo um estímulo mais eficaz para indução de uma resposta imune local, bem como uma resposta sistêmica. As células M não expressam MHC II e não podem processar antígenos, com isso, eles são liberados intactos para APCs profissionais que
20 são abundantes no FAE e na PP. Drenando as PP via vasos linfáticos estão os linfonodos mesentéricos (MLN) que são idênticos em toda estrutura aos outros linfonodos periféricos (Mowat & Viney, 1997).

Ao contrário das PP e MLN que agem como sítios indutores, os linfócitos da lâmina própria e os linfócitos intraepiteliais (IELs) são os
25 componentes efetores da resposta local atuando para gerar imunidade disseminada através de todo o intestino. Após a estimulação antigênica nas PP, as células B e T ativadas saem da PP via linfáticos eferentes e chegam a circulação sistêmica através do ducto torácico. Estes linfócitos, então, entram nos sítios efetores como a lâmina própria dos tratos GI, respiratório e
30 reprodutivo, onde estas células são seletivamente retidas. A lâmina própria contém muitos componentes do sistema imune, com grande número de células

B, plasmócitos, macrófagos, células dendríticas e células T CD4⁺ (maioria) e CD8⁺. Em humanos como em camundongos praticamente todos os IELs são CD8⁺ (80%). Ao contrário das células T do sangue, a maioria dos IELs com TcR $\gamma\delta$ ⁺ e muitos com TcR $\alpha\beta$ ⁺ usam o homodímero CD8 $\alpha\alpha$ ao invés do CD8 $\alpha\beta$, e se desenvolvem nas mucosas sem passar pelo timo (Mowat & Vinney, 1997). Em animais normais, tanto os IELs TCR $\gamma\delta$ ⁺ quanto os $\alpha\beta$ ⁺ expressam receptores de células NK e são potentes efetores citotóxicos capazes de matar células alvo (células epiteliais parasitadas ou infectadas por vírus) por secreção de perforina e/ou Fas/FasL (Guy-Grand *et al.*, 1996) e podem secretar IFN- γ . Em roedores, especialmente animais jovens, as células T TCR $\gamma\delta$ ⁺ predominam enquanto que em humanos, exceto na doença celíaca, as células T TCR $\gamma\delta$ ⁺ são mais raras (< 10%). Estudos recentes têm sugerido que células T TCR $\gamma\delta$ ⁺ têm um papel importante na regulação da resposta imune nas mucosas e na tolerância sistêmica, mas seu mecanismo de ação é pouco entendido. Depleção *in vivo* com anticorpos específicos para TCR $\gamma\delta$ inibe a indução de tolerância em camundongos tratados com OVA (Mengel *et al.*, 1995), reverte a tolerância a enxertos induzida pela imunização pela veia porta (Gorczynski *et al.*, 1996) e induz deficiências na tolerância oral (Ke *et al.*, 1997).

Alguns estudos têm demonstrado que pequena quantidade de antígeno intacto pode atravessar as células epiteliais intestinais e chegar à lâmina própria, linfonodo mesentérico e veia porta (Cornell *et al.*, 1971 e Warshaw *et al.*, 1971). A quantidade de Ag administrado oralmente que pode ser sistemicamente absorvido na forma nativa tem sido estimada em 2 % (Mowat *et al.*, 1987). Portanto, é possível que estes Ags possam chegar diretamente aos tecidos linfóides distantes e serem apresentados por APCs residentes, sendo que o fígado é o órgão que primariamente recebe os antígenos absorvidos pela mucosa intestinal. A importância do sistema imune de mucosa intestinal na resposta a antígenos administrados pela via oral poderia portanto ser avaliada pela administração de antígenos pela veia porta.

b) Tecido linfóide associado à mucosa respiratória

O sistema imune associado ao trato respiratório superior e inferior é composto por tecido linfóide associado ao nariz (NALT em inglês) e aos brônquios (BALT em inglês), linfonodos drenantes (linfonodos cervicais),
5 epitélio respiratório e logo abaixo, um tecido conectivo contendo células imunocompetentes (Davis, 2001). Assim como o GALT, o NALT e o BALT, possuem também células M e IELs, sendo também a maioria linfócitos T $TCR\gamma\delta^+$.

Existem várias vantagens para se explorar o uso da via nasal como via
10 de imunização:

- fácil acesso, alta vascularização e a presença de numerosas microvilosidades recobrimdo o epitélio nasal, gerando uma grande superfície de absorção;
- após a imunização intranasal, tanto respostas imunes de mucosa e sistêmicas podem ser induzidas;
15
- a via nasal pode ser utilizada para imunização de grandes grupos populacionais além de requerer menor quantidade de material que por via oral;
- a imunização intranasal não requer agulhas e seringas, que são fontes potenciais de infecção e, por ser não invasiva, facilita a colaboração do paciente;
20
- ausência de degradação pelo suco gástrico e entérico, possibilitando uma dosagem menor e mais exata que a via oral

c) Sistema imune comum das mucosas

25 As células efectoras do sistema imune que são produzidas em resposta a antígenos e patógenos presentes nos tecidos linfóides das mucosas adquirem um programa específico de circulação que as orientam a retornar aos sítios de mucosas. Após ativação no GALT, os linfócitos diminuem sua expressão de L-selectina (molécula de adesão que proporciona interação com o endotélio das
30 vênulas nos linfonodos periféricos) e aumentam a expressão de $\alpha_4\beta_7$, integrina cujo ligante, MadCAM-1 é expresso pelos vasos sanguíneos das mucosas

(Hamann *et al.*, 1994). Como o MadCAM-1 é expresso nos vasos de todas as mucosas, o conceito de sistema imune comum das mucosas em que linfócitos primados em uma mucosa irão circular para outras mucosas, pode ser explicado.

5 Imunização x Tolerização

A tolerância de mucosa é caracterizada pelo fato de que animais que receberam doses repetidas de antígenos T-dependentes pela via mucosa tornam-se refratários ou têm sua capacidade de desenvolver uma resposta imune sistêmica diminuída quando reexposto a este mesmo antígeno
10 administrado pela via sistêmica. Este fenômeno depende da espécie animal, da idade, da forma e da dose do antígeno e da via de administração (entérica, oral, nasal, retal).

Enquanto uma alta dose está associada à anergia ou deleção de células T efectoras, baixas doses preferencialmente ativam células T
15 regulatórias que secretam citocinas supressoras como IL-4, IL-10 e TGF- β . Células T regulatórias são células que controlam ou suprimem a função de outras células. Os mecanismos regulatórios utilizados e as características específicas desta células estão ainda sendo investigadas. No entanto, pelo menos quatro tipos de células T regulatórias foram descritas: células Th3,
20 células T_R, células T CD4⁺CD25⁺ e células NKT. As células Th3 foram descritas como células produtoras de TGF- β induzidas pela administração oral de antígenos em vários modelos de tolerância (Faria & Weiner, 1999). Estas células parecem requerer células B e coestimulação por B7.2, mas a tolerância por altas doses é independente desses fatores, e é inibida por tratamento com
25 anti-CTLA-4 (Lycke, 1999).

A possibilidade de se manipular o sistema imune das mucosas direcionando para imunidade ou tolerância é bem interessante, quando se considera uma estratégia para proteção do hospedeiro contra colonização e
30 invasão por patógenos na mucosa, mas também para interferir no desenvolvimento de reações imunológicas sistêmicas potencialmente prejudiciais contra um patógeno ou seus produtos.

A tolerância sistêmica induzida pela administração de Ag via mucosa tem sido utilizada para reduzir e/ou suprimir a resposta imune não somente para antígenos estranhos mas também contra antígenos próprios. Tem sido possível, retardar o crescimento e/ou diminuir a intensidade de doenças autoimunes em vários modelos animais por administração de autoantígenos na mucosa intestinal ou respiratória. Por exemplo, a administração oral de colágeno do tipo II retardou o crescimento da artrite autoimune. Similarmente, têm sido possível suprimir uma forma de uveoretinite autoimune por administração oral de antígeno retinal solúvel (S-antígeno). A encefalomielite autoimune experimental pode ser suprimida parcial ou completamente em animais que receberam oralmente a proteína básica de mielina (Weiner, 1997).

Protocolos tolerogênicos têm sido também utilizados na prevenção da rejeição de transplantes, entre eles: a administração de células alogeneicas via veia porta (Gorczynski *et al.*, 1996) e via oral (Sayegh *et al.*, 1992). Tolerização à respostas Th2 também pôde ser obtida após administração via mucosa com resultados promissores (Bagot *et al.*, 1999; Winkler *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2001).

Nem sempre uma imunização de mucosa leva à tolerância. É possível induzir imunização ativa contra imunógenos, particularmente pela via nasal. Chen *et al.* (2004) demonstraram que a vacinação nasal com BCG é mais eficaz que por via s.c. contra tuberculose, e Namikoshi *et al.* (2003) demonstraram que a vacinação intranasal com antígenos de *Porphyromonas gingivalis* induz anticorpos neutralizantes da bactéria, mas esta via serve também para induzir tolerização, assim como a via oral (Metzler & Wraith, 1996). Parece, portanto, que o resultado final de tolerização versus imunidade ativa varia em função do tipo de antígeno, sua dosagem, ou ainda a forma em que ele é administrado.

A literatura patentária sobre o assunto é vasta e possui alguns documentos importantes, que serão detalhados a seguir:

O documento WO 2004/074432 descreve vacinas para diversas condições patológicas, incluindo leishmaniose. No entanto, o método

empregado por esse documento é a ligação do antígeno a um anticorpo específico para APCs, de forma que, ao serem interiorizados, serão processados e apresentados via MHC I, o que favorecerá uma resposta celular.

5 O documento US 2004/170636 descreve vacinas de DNA para o tratamento da leishmaniose, contendo um plasmídeo para o gene A2, que irá propiciar uma resposta imune tanto humoral quanto celular.

O documento US 2004/043032 descreve vacinas a serem aplicadas em mucosas do corpo humano, tais vacinas úteis no tratamento de diversas patologias. No entanto, a vacina a ser aplicada compreende o antígeno e um polímero de carboidratos, onde o polímero compreende monômeros dotados da função aldeído e o mesmo está ligado covalentemente ao antígeno.

Os problemas da técnica anterior, estão relacionadas à complexidade da obtenção dos componentes vacinais, bem como da necessidade da utilização de um adjuvante a fim de suscitar uma resposta imune eficaz. A presente invenção resolve o problema do estado da técnica por utilizar um antígeno tão simples como um antígeno bruto do agente etiológico, que administrado pela via de mucosa apresenta atividade adjuvante *per se*, embora este possa ser utilizado para otimizar o efeito da composição reivindicada.

20

Objetivos da Invenção

Tendo em vista o acima exposto, torna-se de extrema necessidade o desenvolvimento de uma vacina clinicamente eficaz contra leishmaniose, que possa ser administrada por vias alternativas à via parenteral, que induza uma imunidade duradoura. Também há necessidade do desenvolvimento de uma vacina de baixo custo e estável, aplicável à população que habita as áreas endêmicas de leishmaniose.

Como mencionado anteriormente, há a possibilidade de se imunizar mamíferos contra leishmaniose usando parasitos mortos, extratos de parasitos assim como antígenos definidos. Entretanto, somente a imunização intravenosa mostrou-se protetora em camundongos (Howard *et al.*, 1982)

30

enquanto que a imunização s.c. exacerba a lesão (Kenney *et al.*, 1999) quando estes antígenos são administrados sem adjuvantes. Há portanto a situação experimental em que camundongos podem ser eficientemente vacinados contra leishmaniose por via intravenosa ou intraperitoneal, mas que seria
5 inaceitável para uso em humanos.

Estudos foram feitos com o vetor *Salmonella typhimurium* aroA-aroD mutante que é invasivo mas de replicação limitada podendo ser administrado oralmente e chegar ao fígado e baço, replicando nesses órgãos por alguns dias. No entanto, a administração deste vetor tem seu risco inerente por ser
10 um organismo vivo. Quando o gene para gp63 foi inserido no vetor *S. typhimurium* e administrado oralmente em camundongos houve certa proteção à infecção com *L. major*, mas o nível de expressão foi baixo e o plasmídeo foi instável (Xu *et al.*, 1995). O nível de proteção, medida em termos de tamanho da lesão e carga parasitária, só foi substancial quando o gene para gp63 foi
15 inserido junto com os genes para IFN- γ e TNF- α no vetor de *S. typhimurium*. Apesar da via oral ter sido utilizada, esta *Salmonella* atenuada é invasiva promovendo uma estimulação a nível periférico, não servindo portanto para se avaliar a contribuição do sistema imune das mucosas.

A presente invenção visa explorar o efeito sistêmico da imunização por
20 vias de mucosa, preferencialmente as vias de mucosa oral e nasal, com antígenos brutos ou frações de *Leishmania sp.*, além de servir como uma nova estratégia de vacinação que também pode servir para uma melhor compreensão do funcionamento do sistema imune de mucosas usando o modelo murino de leishmaniose para resposta imune celular.

25 A presente invenção proporciona composições de vacinas contendo antígenos brutos de *Leishmania sp.* para serem administradas pelas vias de mucosa na sua forma livre ou formulada em carreadores poliméricos na forma de micropartículas ou nanopartículas.

A presente invenção também proporciona composições de vacinas
30 contendo antígenos brutos de *Leishmania sp.* para serem administradas pelas

vias de mucosa, em que um carreador ou veículo farmacologicamente aceitáveis são utilizados.

A presente invenção também proporciona composições de vacinas contendo antígenos brutos de *Leishmania sp.* para serem administradas pelas vias de mucosa, em que um adjuvante farmacologicamente aceitável pode ser 5 opcionalmente utilizado. Em geral, um dos adjuvantes farmacologicamente aceitáveis seria a subunidade β da toxina colérica (CTB).

Breve Descrição dos Desenhos

10 A Fig.1 demonstra o curso de uma lesão induzida em camundongos BALB/c imunizados e não imunizados pela via oral com a composição da presente invenção e demonstra sua superioridade em relação à via subcutânea.

Camundongos BALB/c foram vacinados com o antígeno bruto (●) ou 15 receberam salina (○) nos dias -14 e -7 que antecederam a infecção da seguinte forma: 100 μ g LaAg pela via oral (painel superior) ou 25 μ g LaAg pela via subcutânea (painel inferior). Os animais foram infectados no dia 0 com *L. amazonensis* na pata e o tamanho das lesões medido nos dias indicados. Média aritmética \pm desvios padrões, n=5. * $p \leq 0.05$.

20 A Fig. 2 demonstra o perfil de citocinas de animais imunizados e não imunizados pela via oral com a composição da presente invenção.

Camundongos BALB/c (n=5) foram imunizados pela via oral com 100 μ g do antígeno total e um reforço com a mesma dose 7 dias depois (barras 25 negras). Os animais controles receberam somente salina PBS (barras brancas). Uma semana após a dose de reforço, os níveis de IFN- γ , TGF- β e IL-10 foram medidos por ELISA nos sobrenadantes de cultura de células de linfonodos periféricos (LP) e mesentéricos (LM) estimuladas com concanavalina A. Médias e desvios padrões de amostras em triplicatas. * $p < 0.01$, em relação aos controles com salina.

A Figs. 3 e 4 demonstram que a vacinação oral com a presente composição é de amplo espectro.

Na Fig. 3 os camundongos BALB/c foram vacinados pela via oral como descrito no exemplo da Figura 1, só que desta vez foram infectados com uma espécie diferente do parasito, a *L. major*. Média \pm desvios padrões (n = 5). * p < 0.01. Já na Fig. 4 os camundongos C57Bl/6 foram vacinados pela via oral conforme descrito para camundongos BALB/c na Figura 1. Média \pm desvios padrões (n = 5). * p < 0.01.

A Fig 5 demonstra que a presente composição também serve para uso intranasal promovendo proteção de longa duração contra a leishmaniose em camundongos.

Camundongos BALB/c foram vacinados pela via intranasal com 10 μ g do antígeno bruto (●) ou receberam somente salina (○). Sete dias depois a dose foi repetida. Quatro meses depois da segunda dose vacinal os animais foram infectados *L. amazonensis* na pata e o tamanho das lesões medido nos dias indicados. Média aritmética \pm desvios padrões, n=5. * p \leq 0.01.

A Fig. 6 demonstra as mudanças sistêmicas na produção de citocinas produzidas pela vacinação intranasal com a presente composição.

Os camundongos foram vacinados conforme descrito no exemplo da Figura 6. No dia 160 após a infecção a produção de IFN- γ e IL-10 foi medido por ELISA no sobrenadante da cultura de células dos linfonodos periféricos poplíteos estimuladas com concanavalina A. Barras brancas são animais não vacinados e barras negras são animais vacinados. Médias \pm desvios padrões de amostras em triplicatas. * p \leq 0.05, em relação aos animais não vacinados. nd=não detectável.

Descrição Detalhada da Invenção

Para fins da presente invenção, o termo “antígeno bruto de *Leishmania sp.*” significa um lisado total de células de promastigotas de *Leishmania sp.* preparado por qualquer metodologia conhecida por aqueles versados na

técnica, tal como por exemplo, método de congelamento e descongelamento. Os termos “antígeno bruto”, “lisado total” e “antígeno total” podem ser intercambiáveis na presente descrição.

5 Para fins da presente invenção, o termo “veículo farmacologicamente aceitável” significa qualquer substância que possa servir como carreador para os antígenos da presente invenção, a fim de tornar possível ou melhorar sua administração através das vias de mucosa. O veículo pode ser qualquer veículo conhecido por aqueles versados na técnica da composição de vacinas para serem administradas pelas vias de mucosa, mais preferencialmente, a 10 mucosa oral e nasal. De preferência, o veículo é um veículo aquoso, como por exemplo, água purificada estéril, ou solução salina, tal como fosfatada tamponada estéril. O veículo pode ser também uma micropartícula ou nanopartícula de composição polimérica de preferência o ácido poli-lático e glicólico (PLGA) ou composição lipídica, de preferência fosfatidilcolina ou 15 qualquer outro componente de lipossomo.

Para fins da presente invenção, o termo “adjuvante farmacologicamente aceitável” significa qualquer substância que melhora a resposta imune a um antígeno com o qual se encontra misturado. Pode ser utilizado qualquer adjuvante conhecido por aqueles versados na técnica, que seja aprovado para 20 uso humano ou animal. Preferencialmente, o adjuvante é adequado para melhorar a resposta imune em sítios de mucosa, mais preferencialmente, mucosa oral e nasal.

Para fins da presente invenção, o termo “composição vacinal” significa uma composição capaz de induzir a resposta imune adaptativa de um 25 hospedeiro contra um determinado patógeno.

A presente composição tem como principal objetivo fornecer formulações contendo antígenos totais de espécies de *Leishmania sp.* em um veículo farmacologicamente aceitável para ser administrado por vias de mucosa, e assim levar a uma proteção duradoura contra leishmaniose 30 cutânea, mucocutânea ou cutânea difusa.

As espécies de *Leishmania sp.* utilizadas na presente invenção podem ser selecionadas, sem limitação, dentre *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani* e *Leishmania chagasi*. Preferencialmente, as composições da presente invenção contém somente
5 uma cepa de *Leishmania sp.*, contudo, em uma modalidade alternativa, a presente invenção pode conter mais do que uma espécie de *Leishmania sp.* em combinação. De preferência as espécies de *Leishmania sp.* são *Leishmania amazonensis* e *Leishmania donovani*.

As promastigotas de *Leishmania sp.* podem ser cultivadas por qualquer
10 metodologia conhecida na técnica. As promastigostas podem ser mantidas, por exemplo, em meio D-MEM (Sigma Chemical Co.) suplementado com penicilina (Cultilab) 100 U/mL e estreptomicina (Cultilab) 100µg/mL e HEPES (Sigma Chemical Co.) a 20 mM e com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab). A cultura pode ser mantida, por exemplo, a 26°C.

O lisado total de antígenos de *Leishmania sp.* pode ser preparado por
15 qualquer método conhecido na técnica. Um dos possíveis métodos envolve, sem limitações, o método de congelamento e o descongelamento (“freeze and thawing”). Pelo presente método, uma cultura de promastigotas *Leishmania sp.*, em fase estacionária deve ser lavada exaustivamente, por um processo,
20 por exemplo, de centrifugação a 1300 x g/ 10 minutos, e lavagem, pelo menos 2 vezes com salina fosfatada tamponada estéril, a fim de retirar as proteínas do soro e meio de cultura. O pellet final é ressuspenso em um veículo aquoso, como água ou salina fosfatada tamponada, e esta suspensão sofre pelo menos três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido
25 ou freezer (-20°C) até o uso. A presente suspensão pode ser, opcionalmente, liofilizada para estoque, e ressuspensa no veículo adequado no momento da administração.

A dosagem de proteínas totais da composição total pode ser feita por
qualquer método conhecido na técnica, como por exemplo, o método de Lowry.

30 De preferência, a presente composição, quando em um veículo aquoso, contém uma concentração de proteínas totais de 10 µg/mL a 10000 µg/mL.

Preferencialmente, a composição da presente invenção contém uma concentração de proteínas totais de 100 µg/mL a 5000 µg/mL. Mais preferencialmente a presente composição contém uma concentração de proteínas totais de 500 µg/mL a 1000 µg/mL.

5 De preferência, a quantidade total de proteínas administrada seria de 1 µg /Kg a 2000 µg /Kg . (proteína / peso corporal). Mais preferencialmente, a quantidade total de proteínas administrada seria de 10 µg/Kg a 1000 µg/Kg (proteína / peso corporal).

De preferência, a presente composição contém um veículo farmaceuticamente aceitável apropriado para administração pela via de mucosa, associado ao antígeno total da presente invenção. De preferência o veículo farmaceuticamente aceitável é um veículo aquoso estéril. Em uma modalidade preferida da presente invenção, o veículo farmaceuticamente aceitável é água destilada estéril. Em outra modalidade alternativa da invenção o veículo farmaceuticamente aceitável é salina fosfatada tamponada estéril.

Em uma modalidade alternativa, a presente invenção pode ser preparada de modo que o lisado total liofilizado possa ser contido em uma cápsula ou em um comprimido com revestimento entérico. Neste caso, a preparação tem como objetivo a administração somente pela via oral. A dose contida em cada cápsula variará de acordo com o peso, idade, estado do indivíduo. Preferencialmente, cada cápsula poderá conter de 0,7 a 700 mg de proteína.

Em outra modalidade alternativa, a presente invenção pode ser preparada de modo que o lisado total possa estar encapsulado em micropartículas ou nanopartículas de polímeros inertes e biodegradáveis, por exemplo ácido poli lático e glicólico (PLGA). Neste caso, a composição poderá ser preparada por qualquer metodologia convencional conhecida pelos versados na técnica, sem limitações. Neste caso, a preparação tem como objetivo a administração pelas vias oral e nasal.

30 Em outra modalidade alternativa, a presente invenção pode ser preparada de modo que o lisado total possa estar encapsulado em partículas

lipossomais. Neste caso, a composição poderá ser preparada por qualquer metodologia convencional conhecida pelos versados na técnica, sem limitações. Neste caso, a preparação tem como objetivo a administração pelas vias oral e nasal.

5 A presente composição pode estar em qualquer forma adequada ao armazenamento. Por exemplo, o antígeno total pode estar na forma liofilizada, e ser reconstituído com o veículo farmacêuticamente aceitável, no momento do uso, pela adição do referido veículo e homogeneização da composição, até a formação, por exemplo, de uma suspensão.

10 Em uma modalidade alternativa da presente invenção, a presente composição pode conter um adjuvante farmacêuticamente aceitável. O adjuvante pode ser qualquer adjuvante adequado. Um adjuvante adequado poderia ser, sem limitações, a subunidade β da toxina colérica (CT).

15 A presente composição pode ser administrada por qualquer forma preferida, conhecida por aqueles versados na técnica.

20 No caso da administração por via nasal, uma modalidade da invenção prevê a administração da composição pela instilação de gotas nasais. Em uma outra modalidade da invenção, a composição pode ser administrada através de aerossóis. Neste caso, a presente composição poderá conter além do veículo, adjuvantes farmacêuticos adequados para administração por esta via, conhecidos por aqueles versados na técnica, tais como propelentes para administração aerossólica, conservantes.

25 No caso da administração pela via oral, em uma modalidade preferida, a administração da composição poderá ocorrer pela ingestão de uma solução líquida contendo o antígeno total da presente invenção. Neste caso poderá ser associado um veículo, preferencialmente aquoso, adequado a ingestão da composição. Neste caso, a presente composição poderá conter ainda adjuvantes farmacêuticos adequados, conhecidos por aqueles versados na técnica tais como agentes suspensores, conservantes.

30 Em uma outra modalidade da invenção, a composição liofilizada poderá estar contida em cápsulas, por exemplo cápsulas gelatinosas duras, ou

comprimidos com revestimento entérico, conhecidos na técnica. Neste caso, a composição poderá ser preparada por qualquer metodologia convencional conhecida pelos versados na técnica, sem limitações. Neste caso, podem ser utilizados os excipientes farmacêuticos conhecidos na técnica. Em uma
5 modalidade especialmente preferida o antígeno liofilizado é associado a lactose e preenchido em uma cápsula gelatinosa dura.

A presente invenção será agora descrita por meio de exemplos não limitantes, que não pretendem limitar o escopo e o âmbito da presente invenção. Os presentes exemplos são somente ilustrativos para que possam
10 facilitar a compreensão da presente invenção.

Exemplos

Exemplo 1. Procedimento geral para preparação da vacina contendo antígeno total de *Leishmania amazonensis*: Em um erlenmeyer estéril de 500
15 ml adicionou-se meio de cultura D-MEM (Cultilab), 0,0005% de hemina, 0,0001% de biotina e 10% de soro fetal bovino (Cultilab). Adicionou-se ao meio de cultura 1 milhão de promastigotas vivas de *Leishmania amazonensis* cepa Josefa. Após cinco dias em agitação leve (30 rotações / min) as culturas axênicas de promastigotas de leishmania foram lavadas 3 vezes em solução
20 salina tamponada (PBS) por centrifugação a 2500 rpm durante 10 min. O sedimento da última centrifugação foi suspenso em PBS a 2×10^8 promastigotas / ml. Esta preparação sofreu 3 ciclos de congelamento a -20°C e descongelamento a $+25^{\circ}\text{C}$ e foi estocada em alíquotas a -20°C por até 1 ano.

25 Exemplo 2. Quantificação de proteínas totais na vacina: Uma alíquota da vacina estocada foi descongelada e e diluída adequadamente até um volume final de 100 μl . Preparou-se uma solução composta de: 1 ml de solução de CuSO_4 1 %, 1 ml de solução de tartarato de sódio e potássio 2% e 48 ml de solução de Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1 M. Adicionou-se ao tubo 1 ml desta
30 solução. Após 10 min de incubação a temperatura ambiente, adicionou-se ao tubo 100 μl do reagente de Folin-Ciocalteu e após agitação vigorosa incubou-

se por 30 min a temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 650 nm e comparou-se os dados com a curva padrão.

Conclusão: A vacina contendo 2×10^8 promastigotas lavados / ml de PBS contem cerca de 1 mg proteína total / ml de PBS.

5

Exemplo 3. Avaliação da eficácia da vacina quando administrada por via subcutânea e por via oral em camundongos BALB/c: No dia do uso, uma alíquota da vacina foi descongelada e resuspensa em PBS para a concentração desejada. Camundongos BALB/c pesando 20 g foram mantidos em jejum total por 3 horas antes da vacinação. Os animais receberam 25 μ g da vacina em 50 μ l de PBS por injeção subcutânea no dorso ou receberam 100 μ g da vacina em 200 μ l de PBS por via oral através da introdução de uma cânula intragástrica acoplada a uma seringa de 1 ml graduada. Após 1 semana o procedimento vacinal foi repetido. Uma semana após a segunda dose da vacina os animais foram infectados na pata com 2×10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fase estacionária de crescimento. O crescimento da lesão foi acompanhado medindo-se o diâmetro da pata com um micropaquímetro (Mitutoyo).

Conclusão: Enquanto que a vacina administrada na ausência de adjuvantes pela via subcutânea induziu o aumento da susceptibilidade dos animais à leishmaniose cutânea causada pela *Leishmania amazonensis*, a mesma vacina administrada pela via oral em uma dose 4 vezes maior para compensar a degradação pelos sucos digestivos aumentou significativamente a resistência dos animais à infecção. Este exemplo indica que a vacina oral é eficaz em camundongos mesmo sem o uso de adjuvantes.

Exemplo 4. Avaliação da imunogenicidade da vacina oral em camundongos: Camundongos BALB/c foram mantidos em jejum total por 3 horas antes da vacinação. Os animais receberam 100 μ g da vacina em 200 μ l de PBS por via oral através da introdução de uma cânula intragástrica acoplada a uma seringa de 1 ml graduada. Após 1 semana o procedimento vacinal foi repetido. Uma semana após a segunda dose da vacina, os níveis de IFN- γ , TGF- β e IL-10

foram medidos por ELISA no sobrenadante da cultura de células de linfonodos periféricos e mesentéricos estimulados com ConA.

Conclusão: Os resultados mostrados na Figura 2 são um exemplo de que a vacinação pela via oral com a composição da presente invenção em sua forma livre ativa a capacidade dos animais de produzir a citocina IFN- γ nos órgãos linfóides periféricos (linfonodos poplíteos) quando devidamente estimulados. Além disso, a vacinação oral com a presente composição também modula a responsividade dos órgãos linfóides locais que drenam a mucosa oral, os linfonodos mesentéricos, em termos de produção de citocinas. Os linfonodos mesentéricos respondem ao estímulo mitogênico com maior produção da citocina TGF- β e menor produção de IL-10. Estas mudanças devem ser importantes para a eficácia vacinal oral demonstrada pela presente composição na Figura 1 do Exemplo 3.

Exemplo 5. Avaliação da eficácia da vacina oral contra a infecção por *Leishmania major*. Camundongos BALB/c foram mantidos em jejum total por 3 horas antes da vacinação. Os animais receberam 100 μ g da vacina em 200 μ l de PBS por via oral através da introdução de uma cânula intragástrica acoplada a uma seringa de 1 ml graduada. Após 1 semana o procedimento vacinal foi repetido. Uma semana após a segunda dose da vacina os animais foram infectados na pata com 2×10^6 promastigotas de *Leishmania major* em fase estacionária de crescimento. O crescimento da lesão foi acompanhado medindo-se o diâmetro da pata com um micropaquímetro (Mitutoyo).

Conclusão: A administração da vacina por via oral promove proteção cruzada contra leishmanias de outras espécies, conforme exemplificado pelo aumento da resistência à infecção com *L. major* na Figura 3, indicando o seu amplo espectro de ação.

Exemplo 6. Avaliação da eficácia da vacina oral em camundongos C57Bl/6: Camundongos C57Bl/6 foram mantidos em jejum total por 3 horas antes da vacinação. Os animais receberam 100 μ g da vacina em 200 μ l de

PBS por via oral através da introdução de uma cânula intragástrica acoplada a uma seringa de 1 ml graduada. Após 1 semana o procedimento vacinal foi repetido. Uma semana após a segunda dose da vacina os animais foram infectados na pata com 2×10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fase estacionária de crescimento. O crescimento da lesão foi acompanhado medindo-se o diâmetro da pata com um micropaquímetro (Mitutoyo).

Conclusão: A proteção produzida pela vacina oral não é restrita a camundongos BALB/c, mas é extensiva a camundongos de outros backgrounds genéticos como o C57Bl/6 (Figura 4), indicando que sua eficácia na população não é restrita.

Exemplo 7. Avaliação da eficácia da vacina administrada por via intranasal em camundongos BALB/c. Camundongos BALB/c receberam por instilação nasal 10 µg da vacina em 20 µl de PBS através de uma ponteira acoplada a uma micropipeta automática. Após 1 semana o procedimento vacinal foi repetido. Quatro meses após a segunda dose da vacina os animais foram infectados na pata com 10^5 promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fase estacionária de crescimento. O crescimento da lesão foi acompanhado medindo-se o diâmetro da pata com um micropaquímetro (Mitutoyo).

Conclusão: O exemplo na Figura 5 mostra que o uso da via nasal também é eficaz para administração da vacina, induzindo uma imunidade protetora de longa duração contra a leishmaniose cutânea em camundongos.

Exemplo 8. Demonstração da modulação da resposta imune durante a infecção de animais pré-vacinados pela via intranasal: Camundongos BALB/c receberam por instilação nasal 10 µg da vacina em 20 µl de PBS através de uma ponteira acoplada a uma micropipeta automática. Após 1 semana o procedimento vacinal foi repetido. Quatro meses após a segunda dose da vacina os animais foram infectados na pata com 10^5 promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fase estacionária de crescimento. No dia 160 de infecção, os níveis de IFN-γ e IL-10 produzidos pelas células dos linfonodos

poplíteos e cervicais foram avaliados no sobrenadante da cultura de células estimulada com Con A por ELISA.

Conclusão: A vacinação intranasal com o antígeno total promove uma maior resposta imunológica quanto à produção de citocinas IFN- γ e IL-10 nos linfonodos periféricos drenantes da lesão (Figura 6). Estas mudanças devem ser importantes para a eficácia vacinal nasal demonstrada pela presente composição na Figura 5 do exemplo 7).

Reivindicações

COMPOSIÇÕES VACINAIS CONTRA LEISHMANIOSE E USOS

- 5 1. Composição vacinal contra leishmaniose **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende antígeno total de *Leishmania sp.* e um veículo farmacologicamente aceitável.
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é administrada por pelo menos uma via de mucosa.
- 10 3. Composição de acordo com as reivindicações 1 e 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é administrada, preferencialmente, pelas vias de mucosa oral e/ou nasal.
4. Composição de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ainda um adjuvante farmacologicamente
- 15 aceitável.
5. Composição de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o adjuvante farmacologicamente aceitável é a subunidade β da toxina colérica (CTB).
6. Composição de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA**
- 20 pelo fato de que a espécie de *Leishmania sp* que compreende o antígeno total da referida composição é selecionado a partir do grupo que consiste em *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Leishmania chagasi* e mistura dos mesmos.
7. Composição de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA**
- 25 pelo fato de que o antígeno total de *Leishmania sp* está na forma liofilizada.
8. Composição de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 a 7, **CARACTERIZADA** pelo fato do veículo farmacologicamente aceitável ser um veículo aquoso.
9. Composição de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA**
- 30 pelo fato do veículo farmacologicamente aceitável ser escolhido dentre água

deionizada estéril, solução salina estéril, salina tamponada fosfatada e mistura dos mesmos.

10. Composição de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADA** pelo fato de que contém uma concentração, em termos de, proteínas totais, de 1 µg/mL a 10000 µg/mL.

11. Composição de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 a 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que encontra-se em cápsulas gelatinosas duras para administração oral.

12. Composição de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que contém uma quantidade total de proteínas de 0,7 a 700 mg de proteína.

13. Composição de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 a 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que encontra-se em microsferas de PLGA para administração oral ou nasal.

14. Composição de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 a 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que encontra-se em lipossomas para administração oral ou nasal.

15. Uso de um antígeno total de *Leishmania sp.* **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na preparação de uma composição de vacina conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 12.

16. Uso de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é administrada por pelo menos uma via de mucosa.

17. Uso de acordo com as reivindicações 14 e 15, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição é administrada, preferencialmente, pelas via de mucosa oral e/ou nasal.

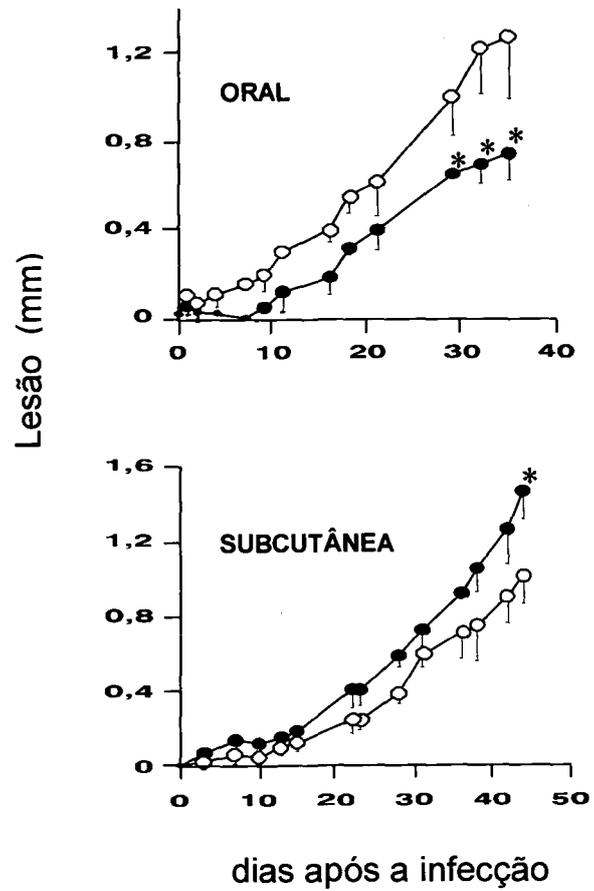


FIGURA 1

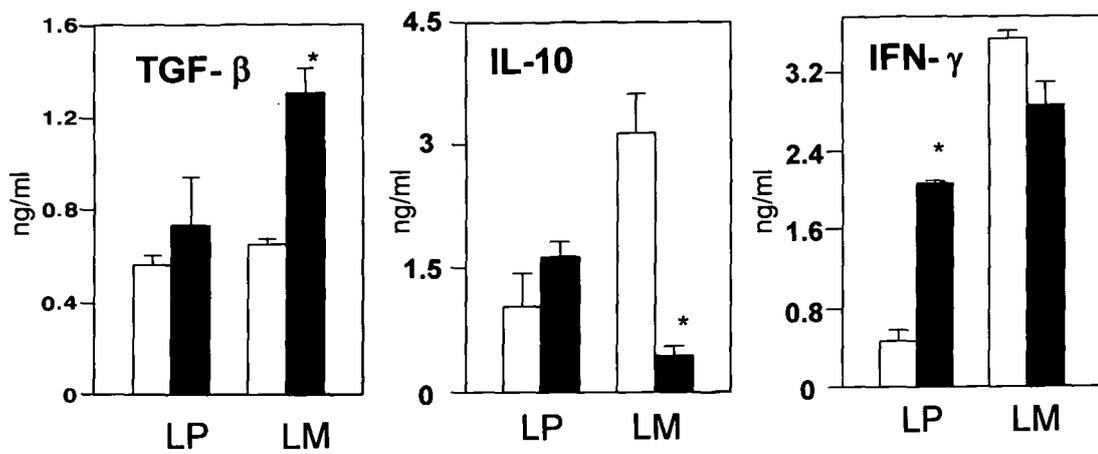


FIGURA 2

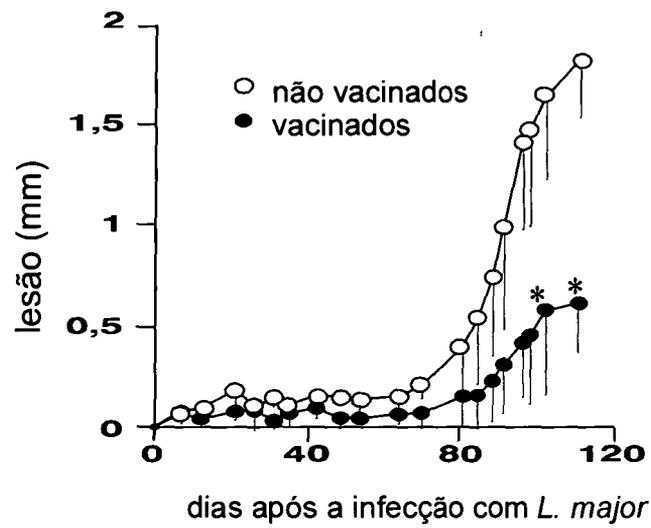


FIGURA 3

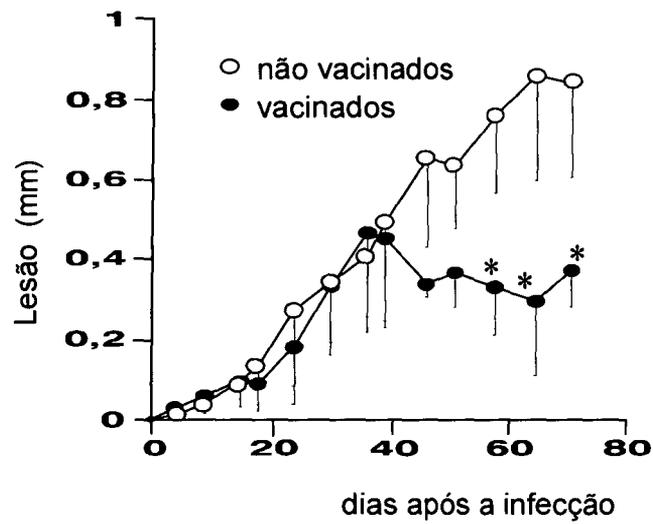


FIGURA 4

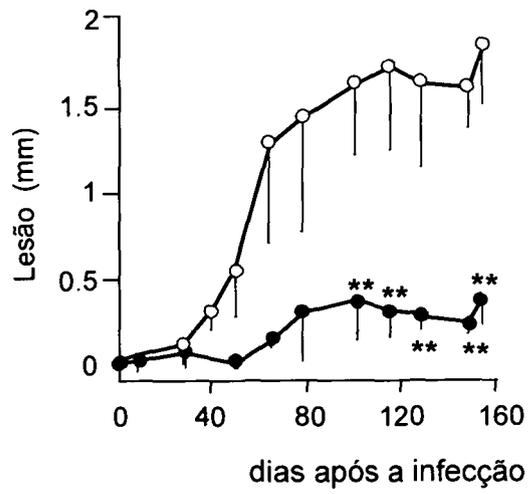


FIGURA 5

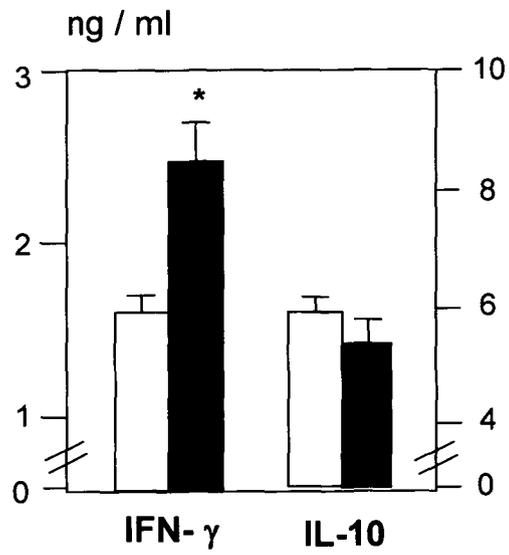


FIGURA 6

Resumo

COMPOSIÇÕES VACINAIS CONTRA LEISHMANIOSE E USOS

- 5 A presente invenção pertence ao campo das composições de vacinas. Mais especificamente a presente invenção relaciona-se a composições de vacinas para serem administradas por vias de mucosa, incluindo preferencialmente a mucosa oral e nasal. Adicionalmente, a presente invenção abrange ainda o uso das referidas composições.