

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Anna Krylová

Vakcíny proti leishmaniózám
Vaccines against leishmaniasis

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Tatiana Spitzová, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.5.2018

Podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování své školitelce RNDr. Tatianě Spitzové, Ph.D. za její cenné rady, trpělivost a vstřícnost při vedení mé bakalářské práce.

Abstrakt

Leishmanióza je jedno ze zanedbávaných tropických onemocnění světa způsobené eukaryotickými jednobuněčnými parazity rodu *Leishmania*. Jejich prokázanými přenašeči jsou dva rody dvoukřídlého hmyzu – *Phlebotomus* ve Starém světě a *Lutzomyia* v Novém světě. V endemických oblastech je leishmaniózou ohrožena více než jedna miliarda lidí. Používané metody v boji proti leishmanióze spočívají v kontrole populace vektorů a podání léků převážně ze skupiny chemoterapeutik, které ale mají vážné vedlejší účinky a jsou málo efektivní. V současnosti není na trhu dostupná žádná lidská preventivní vakcína, ale je registrováno několik vakcín pro psy. Nicméně, intenzivně se testuje celá řada lidských vakcín, z nichž některé mají dobré výsledky v klinických testech a jsou tedy slibnými kandidáty. V této bakalářské práci podám přehled o nejnovějších výzkumech preventivních vakcín proti leishmaniózám a představím jednotlivé přístupy ve vakcinaci.

klíčová slova: leishmanióza, vakcína, *Leishmania*, klinické testy, živá atenuovaná vakcína, DNA vakcína, rekombinantní vakcína, slinné proteiny

Abstract

Leishmaniasis is one of the world's neglected tropical diseases which is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. Proven vectors belong to two species of dipteran insect – *Phlebotomus* in the Old World and *Lutzomyia* in the New World. Over one billion people are at risk in endemic areas. Currently the mean to treat and control leishmaniasis is by vector control and drug treatment, mainly chemotherapeutic, which is linked to severe side effects and has poor efficiency. No prophylactic human vaccine is currently available but several dog vaccines are. However, plenty of vaccines have been intensively tested for human use. Some of them have achieved good results in clinical trials and are promising vaccine candidates. In this bachelor thesis I overview the newest research on vaccines against leishmaniasis and report on several vaccine approaches.

key words: leishmaniasis, vaccine, *Leishmania*, clinical trials, live attenuated vaccine, DNA vaccine, recombinant vaccine, salivary proteins

Seznam zkratek

cDNA	komplementární DNA
CAF01	adjuvans složené z lipozomu a imunomodulačního glykolipidu
CL	kožní leishmanióza
CPA, CPB	cysteinové proteázy A a B
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FBP	fruktóza-1,6-bifosfatáza
FML	fukózo-manózový ligand
GLA-SE	glukopyranosyl lipid ve stabilní emulzi
GP36, GP63	glykoprotein 36, glykoprotein 63
HIS	histon
Hsp70	protein teplotního šoku 70
IFN- γ	interferon gamma
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
KBMA	usmrcené, ale stále metabolicky aktivní
KMP-11	kinetoplastidový membránový protein 11
<i>LaAg</i>	antigeny promastigotů <i>L. amazonensis</i>
LACK	<i>Leishmania</i> homolog of receptors for activated C-kinase, antigen leishmanií
LdPDI	protein disulfid izomeráza <i>L. donovani</i>
LeIF	elongační a iniciační faktor leishmanií
LiESP	exkrecně-sekrecní proteiny <i>L. infantum</i>
LiP0	ribosomální protein P0 <i>L. infantum</i>
LiP2a	ribosomální protein P2a <i>L. infantum</i>
LiP2b	ribosomální protein P2b <i>L. infantum</i>

LmSTI1	inducibilní stresový protein <i>L. major</i>
LPG	lipofosfoglykan
MAX	maxadilan
MCL	kožně-slizniční leishmanióza
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MPL-SE	monofosforyl-lipid A a skvalen
NH	nukleosid hydroláza
PBMCs	periferní krevní mononukleární buňky
PCR	polymerázová řetězová reakce
PMMA	polymethylmethakrylát
PSA	povrchový antigen parazita
ROS	reaktivní formy kyslíku
TGF- β	transformující růstový faktor beta
TNF- α	faktor nádorové nekrózy alfa
TSA	thiol-specifický antioxidant
VL	viscerální leishmanióza
WLL	lyzát celých leishmanií

Obsah

1	Úvod	1
2	Vakcíny první generace	3
2.1	Starý svět	3
2.2	Nový svět	6
3	Vakcíny druhé generace	9
3.1	Starý svět	9
3.1.1	LetiFend®.....	9
3.1.2	CaniLeish®.....	10
3.1.3	LEISH-F1	11
3.2	Nový svět.....	12
3.2.1	Fukózo-manózový ligand, Leishmune®	12
3.2.2	Leish-Tec®.....	14
4	Vakcíny třetí generace.....	15
4.1	Starý svět	16
4.2	Nový svět	18
5	Vakcíny obsahující slinné proteiny flebotomů	20
5.1	Starý svět	20
5.2	Nový svět	21
6	Závěr	25
7	Seznam literatury	27
7.1	Primární citace.....	27
7.2	Sekundární citace	35
7.3	Internetové zdroje.....	35

1 Úvod

Leishmanióza je jedno z nejvíce zanedbávaných tropických onemocnění světa. Způsobují ho eukaryotičtí jednobuněční parazité rodu *Leishmania* přenášení krevsajícím hmyzem podčeledi Phlebotominae. Samice flebotomů se nakazí amastigoty leishmanií při sání krve na savčím hostiteli. Leishmanie se v jejich středním střevě množí a transformují na pohyblivou formu promastigota. Při dalším sání jsou promastigoti inokulováni do nového hostitele, kde se internalizují zejména do makrofágů, ale i do dendritických buněk, neutrofilních granulocytů a monocytů, a přetrvávají tam ve formě amastigotů (shrnutí v Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Leishmanióza je rozšířená převážně v rozvojových zemích v tropických a subtropických oblastech Afriky, Asie, jižní Evropy, Jižní a Střední Ameriky a státech ležících východně od Středozemního moře. Odhaduje se 700 000 až 1 milion nových případů a 20 000 až 30 000 úmrtí ročně. Přibližně 70 druhů zvířat včetně člověka je považováno za přirozené rezervoáry infekce. Podle klinických projevů u lidí můžeme rozlišit tři hlavní formy leishmaniózy. Nejběžnější je kožní forma (CL, cutaneous leishmaniasis), která se projevuje lézí a vředy na kůži, po nichž zůstávají jizvy. Kožně-slizniční leishmanióza (MCL, mucocutaneous leishmaniasis) vede k destrukci sliznic nosu, úst a hrdla. Nejzávažnější je viscerální leishmanióza (VL, visceral leishmaniasis), která postihuje vnitřní orgány, vede ke zvětšení sleziny a jater a k chudokrevnosti (WHO, 2018 [online]).

Na průběh leishmaniózy má vliv kromě druhu parazita i imunitní odpověď hostitele. Leishmanie jako obligátně intracelulární paraziti přežívají v makrofázích apod., kde se schovávají před imunitou hostitele. V prvních chvílích infekce je možné parazita zabít produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) makrofágy. Tento proces je spuštěn fagocytózou a zahrnuje řadu enzymů, například inducibilní syntázu oxidu dusnatého (iNOS), která produkuje oxid dusnatý (NO). Po internalizaci promastigotů reagují vrozené imunitní buňky produkcí cytokinů, které formují vývoj adaptivní imunity, čímž vzniká buď prozánětlivý, nebo protizánětlivý typ odpovědi. Th1 odpověď je charakterizovaná produkcí IFN- γ a TNF- α CD4⁺ T buňkami. Indukuje aktivaci oxidativního stresu makrofágů a vede k rezistenci k leishmanióze. Th2 odpověď vede, za produkce IL-4, IL-13 a IL-10, k neschopnosti kontrolovat infekci leishmanií. Th1/Th2 polarizace je ale zjednodušená, ve skutečnosti ochrana nebo citlivost k infekci nezávisí striktně na produkci zmíněných cytokinů. Například vysoká produkce TNF- α může vést v některých případech k moc silné Th1 odpovědi a vývoji infekce. Th17 T buňky jsou u některých druhů leishmanií asociovány s infekcí a u některých s ochranou před infekcí (shrnutí v Rossi and Fasel, 2017).

Na léčbu leishmanióz se používají převážně pětivazné sloučeniny antimonu a chemoterapeutika amfotericin B, paromomycin a miltefosin. Tyto léky mají mnoho nevýhod jako je vysoká cena, špatná dostupnost v rozvojových zemích, toxicita, dlouhá doba léčby a vznik rezistentních leishmanií. Zatím není dostupná žádná globálně použitelná vakcína proti leishmanióze u lidí. Vzhledem k tomu, že je vyléčení infekce obvykle doprovázeno silnou imunitou, je naděje na její vývoj velká (WHO, 2010).

Nicméně, vývoj vakcín je zdlouhavý proces sestávající ze dvou hlavních fází, předklinické a klinické. Předklinická fáze je zaměřena na tvorbu návrhu vakcíny a hodnocení jejích vlastností, bezpečnosti a imunogenicity na zvířecím modelu. Zjišťuje, jestli se vakcína hodí pro testování na lidech. Poté se testuje ve třech klinických fázích. První fáze klinických testů se provádí na menším počtu zdravých lidí, kteří nejsou vystaveni riziku infekce, před kterou má vakcína chránit. Zjišťuje se zejména klinická tolerance a bezpečnost. Ve druhé i třetí fázi je vakcína testovaná na větším vzorku populace, která by měla reprezentovat cílovou skupinu vakcíny. Ve druhé fázi je definovaná optimální dávka a vakcinační schéma. Třetí fáze je nejrozsáhlejší a poskytuje data pro zhodnocení efektivity a bezpečnosti. Pokud jsou výsledky ze třetí fáze uspokojivé, vakcína může být přijata. Po udělení licence a zavedení vakcíny se uskutečňuje ještě čtvrtá fáze, jejíž cílem je posouzení dlouhodobé účinnosti a vzácných nežádoucích účinků (WHO, 2004).

Cílem mé práce je poskytnout přehled o nejnovějších výzkumech vakcín proti leishmanióze ve Starém a Novém světě. V jednotlivých kapitolách budu představovat studie zaměřené převážně na vývoj lidských a psích vakcín a diskutovat jejich případné využití v terénu.

2 Vakcíny první generace

Vakcíny první generace zahrnují použití celých, usmrcených nebo živých atenuovaných leishmanií. Výhodou je, že oslabené leishmanie napodobují přirozenou infekci a mohou způsobit podobné imunitní reakce bez nutnosti infekce virulentními leishmaniemi (shrnuto v Srivastava *et al.*, 2016). Použití usmrcených leishmanií je levné a technologicky nenáročné, proto jsou potenciálními kandidáty na vakcíny v rozvojových zemích. Zatím se ale neprokázal jejich ochranný účinek proti lidské leishmanióze. Standardizace a kontrola kvality vakcín z usmrcených a oslabených parazitů je stále problematická. Jsou obavy, že se může parazit vrátit do virulentní formy a vyvolat onemocnění (shrnuto v Noazin *et al.*, 2008).

2.1 Starý svět

První a jedinou efektivní vakcínou proti lidské kožní leishmanióze byla tzv. leishmanizace. Je známo, že po zhojení léze po první infekci je jedinec imunní vůči danému druhu leishmanie. Leishmanizace spočívá v infekci živými virulentními parazity na esteticky přijatelné místo na těle zdravých jedinců. Používala se v ohrožených oblastech západní Asie proti CL (shrnuto v Noazin *et al.*, 2008). Dnes je licencovaná pouze v Uzbekistánu, kde spočívá v inokulaci směsi živých a usmrcených *Leishmania major*, které jsou každoročně izolované z aktivní léze, aby se předešlo ztrátě virulence (Gafurov, 1999; citováno v Khamesipour *et al.*, 2006).

Co se týká novějších výzkumů, v Íránu se bezpečnost použití živé *L. major* potvrdila ve studii na 28 obyvatelích z endemické oblasti kožní leishmaniózy. Zdravým dobrovolníkům bez předchozí zkušenosti s infekcí byly podány dvě dávky vakcíny. První byla na ochranu před infekcí a druhá byla podána po zahojení jizev pro kontrolu, jestli byla vakcinace efektivní. U 83 % pacientů byla vytvořena po první dávce léze, což značilo ochranu. U 100 % lidí, kteří vyvinuli lézi, prokázala vakcína ochranný účinek při druhé inokulaci. Pacienti, kteří nevyvinuli po první dávce lézi, ji nevyvinuli ani po druhé dávce a byli považováni za rezistentní k leishmanióze (Khamesipour *et al.*, 2005).

V Indii se na myším modelu testovala vakcína složená z *Leishmania donovani* oslabených zářením gamma. Myši byly očkovány intramuskulárně ve dvou dávkách s odstupem 15 dnů a poté infikované virulentními promastigoty *L. donovani* (Datta *et al.*, 2012a), nebo byly infikované virulentními *L. donovani* a po 75 a 90 dnech od infekce léčeny dvěma dávkami atenuovaných *L. donovani* (Datta *et al.*, 2012b; Datta *et al.*, 2015). Úspěšnost vakcíny byla hodnocena určením počtu parazitů v játrech a slezině. U očkovaných myší byl oproti

neočkovaným infikovaným kontrolám počet parazitů snížen až o 93 % v játrech a až o 88 % ve slezině. Také hmotnost jater byla až o 33 % menší a hmotnost sleziny o 39 % menší. Splenocyty získané z očkovaných myší po stimulaci antigeny *L. donovani* produkovaly až $2,5 \times$ víc NO a až $2 \times$ víc ROS než infikované kontroly (Datta *et al.*, 2012a; Datta *et al.*, 2012b). Byla pozorována až $6 \times$ vyšší úroveň exprese iNOS mRNA a $2 \times$ nižší úroveň exprese TGF- β mRNA oproti kontrolní infikované skupině (Datta *et al.*, 2015). Slibný kandidát na vakcínu proti lidské VL ale neprokázal účinnost při subkutánním podání vakcíny, které je vhodnější pro lidi. Myši dostaly vakcínu ve dvou dávkách a po 15 dnech po vakcinaci byly infikovány *L. donovani*. Počet leishmanií ve slezině a v játrech byl o 21 % a o 24 % menší než u myší infikovaných a neočkovaných. Menší ochrana se projevila i na úrovních produkce NO splenocyty z očkovaných myší, která byla $1,27 \times$ vyšší než u infikovaných kontrol, produkce ROS byla jenom $1,34 \times$ vyšší. Produkce IFN- γ byla zvýšena $1,34 \times$ a IL-10 měl o 22 % nižší hladinu oproti infikované kontrolní skupině (Datta *et al.*, 2016).

Dalším možným kandidátem na vakcínu proti VL v Indii je *L. donovani* atenuovaná delecí genu pro fruktózu-1,6-bifosfatázu (FBP) (Saini *et al.*, 2018). FBP je klíčový enzym katalyzující poslední krok glukoneogeneze, která je rozhodující pro přežití amastigotů v makrofázích (Naderer *et al.*, 2006). Bylo zjištěno, že glukoneogeneze je pro *L. donovani* nezbytná pro replikaci uvnitř makrofágů a jejich proliferaci a přežití ve viscerálních orgánech myší. FBP deficientní leishmanie byly schopny infekce *in vitro* podobně jako původní kmen leishmanie, ale nebyly schopny proliferovat v makrofázích. Proto byly testované *in vivo* v myších, kde ukázaly také omezený růst. Očkované myši byly uměle infikovány virulentními promastigoty *L. donovani* a po pěti týdnech měly třikrát méně parazitů ve slezině než kontrolní myši infikované původním kmenem *L. donovani*. Potvrdilo se, že leishmanie s delecí genu pro FBP jsou schopny infikovat vnitřní orgány myši, ale nemnoží se a nemohou tam přetrvat. Ochrana proti infekci podpořená imunitní odpovědí trvala minimálně 12 týdnů po inokulaci leishmanií. Po stimulaci splenocytů očkovaných a infikovaných myší 5 týdnů po infekci byla pozorovaná zvýšená produkce cytokinů spojených s ochrannou proti leishmaniím (IFN- γ , IL-12 a TGF β) a snížená produkce cytokinu IL-10 spojeného s potlačením imunity proti VL. Úroveň ochrany pozitivně korelovala i s produkcí NO makrofágy z myší po stimulaci antigeny *L. donovani*. Na základě zjištěných dat by *L. donovani* bez genu pro FBP mohla být dobrým modelem pro pochopení závislosti ochrany proti VL na imunomodulaci hostitele a slibným kandidátem na vakcínu proti VL (Saini *et al.*, 2018).

Z dalších vakcín obsahujících leishmanie atenuované genovou delecí se studuje v Indii vakcína složená z *L. donovani* s delecí genu pro centrin1, který reguluje růst (Selvapandiyan

et al., 2004), a *L. donovani* s delecí pro gen p27, což je základní komponenta cytochrom c oxidázy a klíčový gen pro přežívání a růstu parazita v savčím hostiteli (Dey *et al.*, 2010). Při testování na vzorcích periferních krevních mononukleárních buněk (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) izolovaných z lidské krve se ukázalo, že působí stejně jako infekce původním kmenem leishmanií, jelikož byly schopné efektivně infikovat makrofágy. Po inkubaci každé z atenuovaných leishmanií se vzorky z pacientů s vyléčenou VL nebo s probíhající post-kala-azar dermální leishmaniózou vykazovaly PBMCs vyšší produkci IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-2 a IL-17 ve srovnání se vzorky neinfikovaných pacientů a pacientů s aktivní VL. V žádné skupině nevznikaly po stimulaci mutantními *L. donovani* cytokiny IL-4 a IL-10 podporující průběh leishmaniózy. Jelikož vakcíny indukovaly imunitní odpověď srovnatelnou s infekcí původním kmenem leishmanií, mají potenciál jako živé oslabené vakcíny proti VL (Avishek *et al.*, 2016).

Recentně je v Íránu studována vakcína připravená spojením lyzátu celých parazitů *L. major* a lipozomálního nosiče. Výsledkem lýzy detergentem je směs proteinů, fosfolipidů a DNA (whole *Leishmania* lysate, WLL). Úspěšnost vakcíny byla testována na myších, které byly očkovány vakcínou obsahující WLL v různých koncentracích (od 10^3 do 10^7 parazitů v jedné dávce). Myším očkovaných lipozomem s 10^6 parazitů se vytvořil po inokulaci infekčních *L. major* menší otok na rozdíl od ostatních skupin. Počet leishmanií ve slezině nebyl významně rozdílný v očkovaných skupinách a skupině myší očkované prázdným lipozomem. Byl ale značně menší u skupiny očkované lipozomem s obsahem parazitů 10^6 . Nebyla však pozorovaná jednoznačná korelace ochranné imunity a ochrany před leishmaniózou. Vakcinace vyvolala smíšenou Th1/Th2 imunitní odpověď, takže její efektivitu může zlepšit přidání imunostimulačního adjuvans, které podpoří Th1 odpověď (Jafari *et al.*, 2018).

V endemické oblasti výskytu psí VL v Íránu byla testována efektivita vakcíny složené z *Leishmania infantum* oslabené gentamicinem. Ve studii bylo zahrnuto 55 očkovaných a 48 neočkovaných zdravých psů. Psi z první skupiny dostali jednu dávku vakcíny. Poté byly obě skupiny dva roky vystaveny přirozené nákaze v oblasti, kde byla před začátkem studie zjištěna séroprevalence leishmaniózy 40 %. Během prvních tří měsíců studie měli všichni vakcinovaní psi protilátky proti leishmaniím, zatímco skoro všichni neočkovaní psi byli séronegovní. Dál už hladiny protilátek vakcinovaným psům nestoupily, na rozdíl od psů nevakcinovaných. Po 20 měsících pozorování bylo séropozitivních psů celkem 4 % ve vakcinované skupině a 39 % v nevakcinované. Vakcinovaným psům převládaly v séru protilátky typu IgG2, které jsou typické pro Th1 odpověď. V nevakcinované skupině bylo 67 % séropozitivních psů také PCR pozitivních. Na konci studie u žádného z vakcinovaných psů

nebyla přítomna DNA leishmanií a pouze 2 % psů měla klinické abnormality, zatímco u nevakcinovaných psů byla DNA leishmanií i klinické známky VL pozorovány u 29 % psů. Vakcinace nevyvolala žádné vedlejší účinky. Tyto výsledky naznačují, že vakcína poskytla dobrou ochranu v přirozených podmínkách ve vysoce endemické oblasti a je slibným kandidátem proti psí VL (Daneshvar *et al.*, 2014).

Další studované vakcíny jsou uvedené v Tabulce 1.

2.2 Nový svět

V Latinské Americe byly vakcíny první generace předmětem výzkumů od začátku 20. století. V Brazílii se zkoumala pentavalentní vakcína Leishvacin®, která byla později zjednodušena na monovalentní vakcínu obsahující pouze *Leishmania amazonensis* (shrnutí v Noazin *et al.*, 2008).

Efektivitu původní pentavalentní Leishvacin® ve srovnání s jejími jednotlivými složkami testovala studie Mayrink *et al.*, (2002) na myších. Myši byly vakcinovány pěti složkami vakcíny Leishvacin® (mrtví promastigoti *L. amazonensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* a další dva kmeny *Leishmania sp.* – *L. major*-like) s adjuvans *Corynebacterium parvum* a originální vakcínou Leishvacin®. Po 7 dnech jim byli inokulováni promastigoti *L. amazonensis*. Po 60 dnech od inokulace *L. amazonensis* bylo chráněno 80 % očkovaných myší. Po 150 dnech už mělo 40 % vakcinovaných myší lézi, ale byla 10 × menší než u kontrolních myší, které dostaly místo očkování samotné adjuvans. Imunizace všemi testovanými vakcínami vyvolala produkci protilátek proti leishmaniím. Po vakcinaci nebyly pozorovány u žádné skupiny myší otoky. Proliferace buněk sleziny stimulovaných antigeny leishmanie *in vitro* byla u všech očkovaných myší minimálně 3 × vyšší než u kontrolních myší. Všechny myši vykazovaly nízkou produkci IL-4. Zvířata vakcinovaná *L. amazonensis* nebo vakcínou Leishvacin® měla vyšší produkci IFN- γ než ostatní. Všechny testované součásti vakcíny i vakcína sama poskytly myším trvalou ochranu proti infekci, nicméně antigeny *L. amazonensis* vyvolaly nejsilnější imunitní odpověď ze všech složek vakcíny Leishvacin®. Tato studie potvrdila, že *L. amazonensis* má být dále součástí již monovalentní vakcíny (Mayrink *et al.*, 2002).

Vakcína Leishvacin® obsahující už pouze mrtvé promastigoty *L. amazonensis* ochránila myši před umělou infekcí *L. amazonensis*, ale pouze na 8 týdnů. Během této doby produkovaly buňky získané z mízních uzlin a sleziny myší velké množství cytokinů

IFN- γ , IL-2 a IL-17. Po 10 týdnech se začala zvětšovat léze a stoupal počet parazitů v místě vpravení infekčních promastigotů. Spolu se ztrátou ochrany přestaly buňky získané z myši produkovat zmíněné cytokiny. Bylo prokázáno, že pro ochranu vakcínou Leishvacin® je nezbytná přítomnost IFN- γ a iNOS (Carneiro *et al.*, 2014).

Leishvacin® složená z *L. amazonensis* zabité thimerosalem byla testovaná i v Kolumbii v klinické studii třetí fáze. Během jednoho roku bylo sledováno 2597 zdravých dospělých lidí bez předchozí zkušenosti s leishmaniózou. Polovina dostala fyziologický roztok jako placebo a polovina dostala tři dávky *L. amazonensis* zabité thimerosalem. Poté byli vystaveni přirozené infekci v oblasti severozápadní Kolumbie, kde je vysoké riziko CL a MCL způsobené *Leishmania panamensis*. Počet lidí nakažených CL byl v obou skupinách srovnatelný – v placebo skupině byl 6,8 % a ve vakcinované skupině 7,8 %. Po vakcinaci mělo 84 % očkovaných lidí pozitivní kožní test na leishmanie, u placebo skupiny to bylo jen 17 %. Vakcinace byla imunogenní a bezpečná, ale nevykázala žádnou ochranu proti CL způsobené *L. panamensis* v Kolumbii (Vélez *et al.*, 2005).

V Novém světě se rovněž zkoumala vakcína složená z promastigotů *L. infantum* (= *L. chagasi*) ošetřených psoralenovou sloučeninou amotosalenem a nízkou dávkou ultrafialového záření typu A. Takto jsou paraziti usmrceni, ale stále metabolicky aktivní (KBMA, killed but metabolically active). Promastigoti KBMA *L. infantum* (= *L. chagasi*) byly schopni stejně jako živé leishmanie infikovat *in vitro* i *in vivo* myši makrofágy a přetrvat tam dočasně (až 72 h) ve formě amastigotů. Také *in vitro* indukovali produkci NO v přítomnosti IFN- γ . Myši byly subkutánně očkované třemi dávkami KBMA nebo živou *L. infantum* (= *L. chagasi*) s rozestupem 2 týdnů. Jedna skupina myši byla 2 týdny a druhá 8 týdnů po poslední dávce nitrožilně infikovaná živou virulentní *L. infantum* (= *L. chagasi*). Oproti kontrolám očkovaných fyziologickým roztokem měly obě skupiny myši podobnou ochranu proti infekci, což značilo, že účinek vakcinace je dlouhodobý. Ochrana myši očkovaných živými parazity byla podobná, jako u myši očkovaných KBMA leishmaniemi. Myši, které byly očkované živými *L. infantum* (= *L. chagasi*), byly také oproti neočkovaným kontrolám chráněny. Po inokulaci myším nezpůsobily KBMA *L. infantum* (= *L. chagasi*) hepatosplenomegalii jako živé *L. infantum* (= *L. chagasi*) a nebyly detekovatelné v játrech ani ve slezině. Opětovná stimulace splenocytů očkovaných myši leishmaniemi indukovala specifickou T-buněčnou odpověď, ale pouze *ex vivo*. Přístup oslabení do stavu KBMA představuje potenciálně bezpečnou a efektivní strategii proti *L. infantum* (= *L. chagasi*), ale i dalším intracelulárním patogenům. Postup KBMA umožňuje jednoduše a velkoplošně atenuovat populaci patogenních mikrobů. Tato metoda by mohla najít využití i jako součást

vakcíny obsahující parazity atenuované víc cíleně, například delecí nebo modifikací genu, ale i jako adjuvans k jiným vakcínám díky schopnosti vyvolat tvorbu efektorových a paměťových buněk (Bruhn *et al.*, 2012).

Jedním z dalších pokusů o vývoj vakcíny proti lidské VL bylo přidání vhodného adjuvans k usmrceným a poté rozrušeným *L. amazonensis*. Kandidát na vakcínu byl testovaný s adjuvans CAF01 (adjuvans složené z lipozomu a imunomodulačního glykolipidu – syntetického mykobakteriálního cord-faktoru) ve snaze zvýšit imunitní odpověď proti infekci *L. infantum* (=chagasi). Vakcína složená z antigenů promastigotů *L. amazonensis* (LaAg) a CAF01 byla intranasálně podaná myším. Po dvou dávkách vakcíny byly myši nitrožilně infikované promastigoty *L. infantum* (=chagasi). Počet parazitů v játrech i slezině byl u očkovaných myši významně snížen na rozdíl od myši očkovaných LaAg bez adjuvans, samotným adjuvans nebo fyziologickým roztokem. Ochrana myši korelovala pozitivně s mírou produkce IFN- γ a NO splenocyty myši znovu stimulovanými *in vitro* antigeny *L. infantum* (=chagasi). Stejně tak u zvířat, která nebyla chráněna, byla vyšší produkce IL-4, což naznačovalo jeho spojitost s infekcí leishmaniemi. V séru myši očkovaných vakcínou s adjuvans nebo bez adjuvans bylo naměřeno podobně protilátek IgG, IgG1 a IgG2a. Hladina těchto protilátek byla u obou skupin vyšší než u myši očkovaných fyziologickým roztokem nebo samotným adjuvans. Ukázalo se, že adjuvans CAF01 se přímo nepodílí na produkci protilátek, ale jeho spojení s LaAg zvýšilo účinnost vakcíny (Leal *et al.*, 2015).

Tabulka 1: Další studované vakcíny první generace

popis vakcíny	reference
<i>L. donovani</i> atenuovaná delecí genu pro centrin	(Ismail <i>et al.</i> , 2017)
<i>L. infantum</i> atenuované mutací v genu hsp70-II	(Solana <i>et al.</i> , 2017)

3 Vakcíny druhé generace

Vakcíny druhé generace zahrnují použití purifikovaných a rekombinantních proteinů leishmanií. Několik z nich bylo schváleno pro komerční prodej, jako vakcíny proti psí leishmáníze – Leishmune® a Leish-tec® v Brazílii a Canileish® v Evropské unii (shrnutí v Jain and Jain, 2015). Nově je také k dispozici vakcína LetiFend® proti psí leishmáníze registrovaná v EU (Fernández Cotrina *et al.*, 2018). Prvním kandidátem na lidskou vakcínu byl antigen LEISH-F1, jenž dosáhl druhé fáze klinických studií. Po tomto úspěchu byla navržena zdokonalená vakcína LEISH-F2, která také postoupila do druhé fáze klinických testů, a LEISH-F3, která se nachází v první fázi (viz Tabulka 2) (shrnutí v Gillespie *et al.*, 2016).

Jelikož antigeny ve vakcínách jsou chemicky definované, je jejich obsah plně znám, jsou snadno standardizovatelné (shrnutí v Mendonça, 2016) a jsou tak vhodné k masovému použití. Nevýhodou vakcín druhé generace je, že samotné rekombinantní proteiny vyvolávají často jen slabou T-buněčnou imunitní odpověď. Tuto funkci musí zastat vhodné adjuvans, jehož výběr představuje další problémy. Současně používaná adjuvans v lidských vakcínách, jako je alum nebo monofosforyl lipid A, nejsou vyhovující pro stimulaci Th1 imunitní odpovědi (shrnutí v Alvar *et al.*, 2013).

3.1 Starý svět

3.1.1 LetiFend®

Letifend® je vakcína určena pro psy. Je registrovaná od roku 2016 v Evropské unii proti leishmáníze způsobené *L. infantum* (shrnutí v Reguera *et al.*, 2016). Obsahuje rekombinantní Protein Q, který vznikl fúzí pěti antigenů ze čtyř proteinů *L. infantum*: z ribozomálních proteinů LiP2a, LiP2b a LiP0 a z histonu H2A (Soto *et al.*, 1998), které byly dříve vyhodnoceny jako antigenní proteiny pro myši (Molano *et al.*, 2003; Parody *et al.*, 2004) a psy (Molano *et al.*, 2003; Carcelén *et al.*, 2009). Jedna dávka rekombinantního proteinu Q bez adjuvantu stačila na ochranu psů proti leishmáníze při umělé nákaze (Carcelén *et al.*, 2009).

Ve dvouleté terénní studii na několika ohrožených místech ve Francii a Španělsku byla zkoumána efektivita a bezpečnost vakcíny. Studie se zúčastnilo 549 zdravých psů různých věkových a hmotnostních kategorií a plemen. Z toho 275 psů dostalo vakcínu a 274 placebo. Jak se ukázalo dříve (Carcelén *et al.*, 2009), vakcína vyvolala produkci IgG2 protilátek proti Proteinu Q. Nejvyšší hladiny protilátek byly 14 dní po každé dávce (tzn. po první dávce a po přeočkování po roce) a poté klesly. Přítomnost leishmanií zjištěna PCR a roztěrem

z lymfatických orgánů byla na konci studie u 9 % vakcinovaných a 16 % kontrolních psů. Potvrzené případy leishmaniózy byly u 10 % psů z kontrolní skupiny a 5 % psů z očkované skupiny, kde měly mírnější průběh ve srovnání s kontrolami. Efektivita vakcíny byla stanovena na vzorku psů ze dvou míst, kde byla největší incidence leishmaniózy. V placebo skupině byla u 35 % psů potvrzená leishmanióza, zatímco v očkované skupině byla jenom u 10 % psů (Fernández Cotrina *et al.*, 2018). Protilátky v séru psů, kteří byli po vakcinaci Q proteinem, nereagovaly se sérologickými diagnostickými testy, lze tedy rozlišit očkovaná a infikovaná zvířata (Carcelén *et al.*, 2009). Bylo prokázáno, že vakcína je naprosto bezpečná (Carcelén *et al.*, 2009; Fernández Cotrina *et al.*, 2018). Nevyvolala žádné vedlejší účinky ani v různorodé psí populaci. Souvisí to s tím, že se podává jen jedna dávka bez adjuvantu (Fernández Cotrina *et al.*, 2018).

3.1.2 CaniLeish®

Tato vakcína je složená z purifikovaných exkrečně-sekrecních proteinů *L. infantum* (LiESP) a adjuvantu saponinu. Je registrovaná v Evropské unii pod názvem CaniLeish® (Moreno *et al.*, 2012).

V terénní studii v Itálii a Španělsku bylo 90 psů vystaveno přirozené nákaze *L. infantum*, z toho 46 bylo očkovaných a 44 dostalo placebo. Po dvou letech bylo 33 % kontrolních psů infikovaných leishmaniózou, zatímco z vakcinovaných psů mělo infekci pouze 12 %. Symptomy nemoci mělo 23 % kontrolních psů. U této skupiny psů byly projevy nemoci závažnější než u očkovaných zvířat, kde se vyskytly symptomy v 7 % a byly detekovatelné například jen pomocí krevního obrazu. Vakcína tak ochránila 93 % psů a působila preventivně proti vzniku symptomatické leishmaniózy v 68 % případů. Z kontrolní skupiny bylo 5 potvrzených úmrtí na VL, zatímco v očkované skupině nebyl zaznamenán žádný případ (Oliva *et al.*, 2014). Po vystavení přirozené nákaze nebyly rozdíly v počtu *Leishmania*-PCR pozitivních zvířat mezi očkovanou a neočkovanou skupinou psů. Vakcína tedy nezabraňuje průniku leishmanií do hostitele a jejich migraci po těle (Oliva *et al.*, 2014), a proto je pro ochranu psů před VL doporučeno použít kombinaci vakcíny s insekticidem (Brianti *et al.*, 2016).

Bylo zjištěno, že vakcína vyvolává ve psech humorální i buněčnou imunitní odpověď krátce po kompletním očkování (Moreno *et al.*, 2012). Buněčná odpověď přetrvává po celý rok (Moreno *et al.*, 2014) a má ochranný účinek i po roce při umělé nákaze psů infekčními

promastigoty (Martin *et al.*, 2014). V řadě studií vyšlo najevo, že psi po vakcinaci vyvinuli IgG2 orientovanou protilátkovou odpověď proti ESP a zejména proti povrchovému antigenu parazita (PSA), což je hlavní antigenní část LiESP (Moreno *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2014; Oliva *et al.*, 2014). Po očkování získali psi schopnost generovat T buňky, které produkují Th1 orientovaný cytokin IFN- γ . Tyto buňky *in vitro* aktivovaly infikované makrofágy k usmrcení intracelulárních leishmanií pomocí exprese iNOS a produkce derivátů NO (Moreno *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2014). Psi snášeli vakcínu dobře, byl pozorován pouze lokální otok po druhém a třetím očkování, který odezněl do několika dnů (Oliva *et al.*, 2014).

3.1.3 LEISH-F1

Vakcína LEISH-F1 (nebo také Leish-111f) obsahuje rekombinantní polyprotein, který vznikl fúzí tří antigenů leishmanií: homologu eukaryotického thiol-specifického antioxidantu (TSA), inducibilního stresového proteinu *L. major* (LmSTI1), elongačního a iniciačního faktoru leishmanií (LeIF), a adjuvans monofosforyl-lipid A + skvalen (MPL-SE) (Coler *et al.*, 2002; Skeiky *et al.*, 2002). Spojení jednotlivých antigenů do polyproteinu zjednodušilo výrobu vakcíny a snížilo její cenu. Navíc se zvýšil počet epitopů, které mohou vyvolat Th1 imunitní odpověď a ochránit před infekcí lidskou populaci s různými typy MHC glykoproteinů (Coler *et al.*, 2002). Protein TSA je konstitutivně exprimován v promastigotech a amastigotech *L. major*. Rekombinantní TSA s IL-12 působil jako ochrana proti umělé infekci promastigoty *L. major* u myši a vyvolal silnou buněčnou a protilátkovou imunitní odpověď. U pacientů s aktivní CL a VL vyvolal *in vitro* silnou proliferaci periferních krevních mononukleárních buněk (Webb *et al.*, 1998). Rekombinantní LeIF stimuloval *in vitro* produkci Th1 cytokinů buňkami získanými z mízních uzlin infikovaných myši a měl podobný adjuvantní účinek jako IL-12. Působil i jako částečná ochrana proti infekci *L. major* u myši *in vivo* (Skeiky *et al.*, 1998). Myši a makakové, kteří byli očkováni vakcínou složenou z TSA, LmSTI1 a adjuvantu IL-12 a následně jim byla inokulována *L. major*, byli chráněni před CL (Campos-Neto *et al.*, 2001).

Vakcína LEISH-F1 prokázala ochranu myši proti infekci *L. major* (Coler *et al.*, 2002; Skeiky *et al.*, 2002) a *L. amazonensis* (Coler *et al.*, 2002) a u myši a křečků proti *L. infantum* (Coler *et al.*, 2007). Ve světle těchto výsledků byla vakcína LEISH-F1 testována v řadě klinických studií. Pacienti dostali 3 dávky vakcíny obsahující LEISH-F1 a MPL-SE s rozestupem 28 dnů. Vakcína byla imunogenní jak u zdravých pacientů, kteří v minulosti neměli leishmaniózu (Vélez *et al.*, 2009; Chakravarty *et al.*, 2011), tak u pacientů, kteří ji měli (Chakravarty *et al.*, 2011), i u těch, kteří mají aktivní CL (Nascimento *et al.*, 2010) nebo MCL

(Llanos-Cuentas *et al.*, 2010). Ve dvou studiích na pacientech s CL a ML se díky vakcinaci uzdravili dříve ti, kteří dostali kromě chemoterapie vakcínu obsahující LEISH-F1 + MPL-SE než kontrolní skupina, která dostávala pouze chemoterapeutika. Podíl vyléčených vakcinovaných pacientů byl 84. den studie 59–80 %, zatímco u nevakcinovaných lidí byl 38–50 % (Llanos-Cuentas *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010). Vakcína měla tedy i terapeutický účinek a její použití spolu s běžně užívanými chemoterapeutiky umožnilo snížení jejich dávek a také to snížilo pravděpodobnost relapsu onemocnění (Nascimento *et al.*, 2010).

U všech pacientů vyvolalo očkování produkci IgG protilátek proti LEISH-F1, které zůstaly až do 168. dne po první dávce (Vélez *et al.*, 2009; Llanos-Cuentas *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010). Byly pozorovány i vyšší hladiny cytokinů IFN- γ a IL-5 (Vélez *et al.*, 2009; Llanos-Cuentas *et al.*, 2010; Chakravarty *et al.*, 2011). Většina pacientů měla přecitlivělost oddáleného typu (Vélez *et al.*, 2009; Llanos-Cuentas *et al.*, 2010). Vakcinace vyvolala skoro u všech pacientů mírné až středně závažné vedlejší účinky, spojené především s lokální reakcí po injekci. Nebyly ale žádné případy vážných nebo smrtelných reakcí, proto je vakcína hodnocena jako bezpečná (Vélez *et al.*, 2009; Llanos-Cuentas *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010; Chakravarty *et al.*, 2011).

Na rozdíl od předchozích výsledků vakcína neposkytla žádnou ochranu ve třetí fázi klinického testu na psech, kteří byli vystavení přirozené infekci v Itálii. Psi byli navíc koinfikováni ehrlichielemi (Gradoni *et al.*, 2005), které mohou potlačit expresi MHC receptorů II. třídy a narušit buněčnou imunitní odpověď na leishmanie (Harrus *et al.*, 2003). Všechny studie pracovaly se vzorkem okolo 27–46 vakcinovaných lidí. Pro zjištění účinků vakcíny na lidi je potřeba dalšího výzkumu s většími vzorky pacientů (Llanos-Cuentas *et al.*, 2010; Chakravarty *et al.*, 2011).

3.2 Nový svět

3.2.1 Leishmune®

Vakcína obsahující fukózo-manózový ligand (FML) byla v roce 2003 patentovaná v Brazílii proti psí viscerální leishmanióze pod názvem Leishmune®. Je složená z FML antigenu izolovaného z promastigotů *L. donovani* a adjuvantu saponinu (Nogueira *et al.*, 2005). FML představuje jeden z hlavních povrchových antigenů promastigotů a amastigotů *L. donovani*. Skládá se z komplexu glykoproteinů, kde glykoprotein GP36 figuruje jako hlavní antigen (Palatnik-de-Sousa, 1993). Při testování funkcí FML se zjistilo, že se chová jako ligand pro

internalizační receptory makrofágů (Palatnik *et al.*, 1989) a inhibitor penetrace promastigotů a amastigotů do makrofágů. Rovněž vyvolává silnou protilátkovou imunitní reakci u hostitele (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 1993).

Leishmune® se řadí mezi vakcíny blokující přenos leishmanií flebotomem na základě experimentů, kde byla vypitvaná střeva *Lutzomyia longipalpis* inkubovaná s FML antigenem a poté s procyklickými promastigoty *L. donovani* nebo *L. infantum* (= *L. chagasi*). Ačkoliv je antigen izolovaný z *L. donovani*, inhiboval vazbu obou leishmanií. Dělo se tak, i když byly použity Fab-fragменты protilátek získaných z očkovaných psů. Bylo to potvrzeno i *in vivo*, když *Lu. longipalpis* sály na směsi obsahující lidskou krev, amastigoty *L. infantum* (= *L. chagasi*) a séra ze psů odebraná před imunizací nebo 12 měsíců po imunizaci. Leishmanie ve střevech mělo až 61 % kontrolních flebotomů, ale u těch, kteří sáli na směsi se sérem očkovaných psů, se vyskytly pouze v 31 %. Vakcína tedy ochránila 79 % flebotomů (Saraiva *et al.*, 2006).

V terénních studiích v endemických oblastech s viscerální leishmaniózou vakcína ochránila 92–99 % očkovaných psů. Ochranný účinek trval 24 až 41 měsíců. Psi, u kterých se i přes očkování objevila VL, měli mírnější projevy nemoci než kontrolní skupina a byla u nich minimální úmrtnost na leishmaniózu. U kontrol skončila nemoc častěji fatálně (da Silva *et al.*, 2000; Borja-Cabrera *et al.*, 2002, 2008). U všech očkovaných psů byla zjištěna absence leishmanií (da Silva *et al.*, 2000; Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2005) a silná FML-séropozitivita. Komplikaci představoval fakt, že FML-antigen vyvolal u psů silnou humorální odpověď (Nogueira *et al.*, 2005). Díky tomu, že psům zůstaly protilátky až 6 měsíců po vakcinaci, se nedalo pomocí sérologických metod zjistit, jestli byl pes očkovaný, nebo má infekci. Proto bylo doporučeno používat i jiné, například molekulární přístupy, aby se zamezilo zbytečnému utrácení očkovaných psů (Marcondes *et al.*, 2011, 2013).

Bezpečnost vakcíny byla testovaná na 600 psech z ohrožených oblastí v Brazílii. Byly pozorovány pouze mírné vedlejší účinky, které odezněly do několika dnů (Parra *et al.*, 2007). Na stejné skupině očkovaných psů a další skupině 558 kontrolních psů byla prováděna i další studie. U 59 % psů z očkované skupiny se vyskytla přecitlivělost oddáleného typu, což ukázalo, že Leishmune® spouští nejen humorální, ale i buněčnou imunitní odpověď. Očkovaní psi měli snížené počty CD4+ lymfocytů a zvýšené počty CD8+ a CD21+ lymfocytů. To potvrdilo silný ochranný účinek a silnou imunogenicitu vakcíny (Borja-Cabrera *et al.*, 2008). Ochrana vakcíny zprostředkovaná interakcí vrozené a adaptivní imunity byla prokázána v další studii na 33 psech, kteří byli 1,6 a 10 měsíců po vakcinaci. Leishmune® indukoval až rok trvající změny v imunitní odpovědi zprostředkované podpurnými imunologickými procesy – například

zvýšenou fagocytickou aktivitou neutrofilů a monocytů doprovázenou zvýšením produkce NO, vyššími hladinami aktivačních a kostimulačních molekul a zvýšením produkce IFN- γ a IL-17 T buňkami (Moreira *et al.*, 2016).

Navzdory vysoké úspěšnosti vakcíny v terénních studiích byla licence pro výrobu vakcíny Leishmune® v roce 2014 přerušena Ministerstvem zemědělství v Brazílii z důvodu nesplnění všech podmínek studie třetí fáze (Conselho Regional de Medicina Veterinária da Paraíba, 2014 [online]).

3.2.2 Leish-Tec®

Další vakcínou proti psí VL registrovanou v Brazílii je Leish-Tec®. Obsahuje rekombinantní protein A2 a saponin jako adjuvans (shrnuto v Thomaz-Soccol *et al.*, 2017). Proteiny A2 jsou hojně exprimovány amastigoty *L. infantum* (= *L. chagasi*), *L. amazonensis* (Carvalho *et al.*, 2002) a *L. donovani*. Jsou to jedny z virulenčních faktorů leishmanií pro přežití v savčím hostiteli (Charest and Matlashewski, 1994).

V terénních studiích na psech v oblasti s velkou prevalencí leishmaniózy způsobené *L. infantum* (= *chagasi*) a *L. amazonensis* se u očkovaných psů v porovnání s neočkovanou skupinou zmínil počet nákaz VL o 71–93 %. Infekčnost *Lu. longipalpis*, které sály na očkovaných psech byla o 32–47 % nižší než u flebotomů, kteří sáli na kontrolních psech (de Souza Testasicca *et al.*, 2014; Regina-Silva *et al.*, 2016). Očekávaná úroveň ochrany se ale neprokázala v další terénní studii, kde se u 43 % vakcinovaných psů vyvinula VL (Grimaldi *et al.*, 2017).

Imunizace rekombinantním antigenem A2 vedla již dříve u myší k ochraně před experimentální infekcí *L. donovani* (Ghosh *et al.*, 2001) a *L. amazonensis* (Coelho *et al.*, 2003). V obou případech byla pozorována ochranná imunitní reakce. V séru myší byly přítomné protilátky proti antigenu A2. Také splenocyty získané z myší stimulovaných rekombinantním A2 produkovaly IFN- γ (Ghosh *et al.*, 2001; Coelho *et al.*, 2003). Bylo také pozorováno, že A2 blokuje internalizaci amastigotů do makrofágů *in vitro* (Ghosh *et al.*, 2001). U psů byly po vakcinaci rekombinantním A2 a saponinem pozorovány zvýšené hladiny IFN- γ a nízké hladiny IL-10 (Fernandes *et al.*, 2008). Očkování vyvolalo u psů vysokou tvorbu IgG a IgG2 protilátek proti proteinu A2, ale nevznikaly protilátky proti antigenům promastigotů, které se používají v diagnostických testech na psí leishmaniózu, takže nebyl problém rozlišit očkované psy od infikovaných (Fernandes *et al.*, 2008; de Souza Testasicca *et al.*, 2014; Grimaldi *et al.*, 2017).

Vedlejší účinky byly ve srovnání s vakcínou Leishmune® častější. Až 13 % psů mělo celosystémové vedlejší účinky, odezněly ale nejpozději do 5 dnů od třetí dávky vakcíny (Fernandes *et al.*, 2014).

Rekombinantní protein A2 se dále studuje pro použití proti lidské leishmanióze. Byl vyvinut vylepšený A2 gen, který obsahuje méně repetitivních oblastí než původní sekvence. Je tak vhodnější pro expresi bakterií, a přitom neztratil svoji antigenicitu. Nová formulace A2 může být vhodnou cestou pro vývoj vakcíny proti VL (Almeida *et al.*, 2018).

Tabulka 2: Další studované vakcíny druhé generace

název vakcíny	popis antigenu	reference
LEISH-F2	rekombinantní polyprotein Leish-110f vytvořený úpravou proteinu Leish-111f	(Bertholet <i>et al.</i> , 2009)
LEISH-F3	rekombinantní polyprotein složený z nukleosid hydrolázy <i>L. donovani</i> a sterol 24-C-methyltransferázy <i>L. infantum</i>	(Coler <i>et al.</i> , 2015)
GP36	antigenní část povrchového proteinu FML <i>L. donovani</i>	(Paraguai de Souza <i>et al.</i> , 2001)
GP63	povrchový protein leishmanií	(Firouzmand <i>et al.</i> , 2017)
KMP-11	kinetoplastidový membránový protein	(Chaudhary <i>et al.</i> , 2014)

4 Vakcíny třetí generace

Vakcíny třetí generace sestávají z antigenních proteinů leishmanií kódovaných nejčastěji plasmidovým DNA vektorem, který umožňuje jejich produkci v eukaryotické buňce. Intenzivní replikace bakteriální DNA v savčím hostiteli vede k expresi rekombinantních proteinů po delší dobu. Nicméně přesný mechanismus účinku DNA vakcín ještě není plně znám. Výhodou těchto vakcín je, že jsou velmi stabilní a nemusí být uchovávány v chladu. Tím se usnadňuje jejich distribuce v tropických podmínkách s omezenou infrastrukturou. Také lze jednoduše docílit vakcinace několika antigeny použitím více plazmidů. Riziko představuje to, že vakcíny s plasmidovou DNA by mohly vyvolat rezistenci na určitá antibiotika (shrnutí v Kumar and Samant, 2016). Největší obavou však je, že se DNA parazita může integrovat do savčího

genomu a způsobit tak rakovinné nebo autoimunitní onemocnění. Ve studiích bezpečnosti se ale ukázalo, že je to nepravděpodobné (Sheets *et al.*, 2006).

V této kapitole jsem se věnovala nejzkoumanějším antigenům, jako například gp63, Hsp70, LACK, A2, TSA a další, viz Tabulka 3.

4.1 Starý svět

V Indii se proti infekci *L. donovani* studuje vakcína obsahující povrchový glykoprotein 63 (gp63) a protein teplotního šoku 70 (heat shock protein 70, Hsp70). Myši byly očkované vakcínou obsahující komplementární DNA (cDNA) proteinů gp63, nebo Hsp70, nebo jejich kombinací. Po kompletním očkování jim byli vpraveni promastigoti *L. donovani*. Ochrana stanovená počtem parazitů v játrech a slezině byla pozorována u všech očkováných myší. Největší snížení počtu leishmanií ale bylo viděno u myší očkováných kombinací cDNA obou antigenů. Stejně tak skupina očkováná kombinací antigenů měla největší přecitlivělost oddáleného typu a nejvyšší hladinu Th1 protilátek IgG2a (Kaur *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2016).

Vakcína obsahující plazmidy, které nesou geny pro LeIF (elongační a iniciační faktor leishmanie), LACK (*Leishmania* homolog of receptors for activated C-kinase) a TSA (thiol specifický antioxidant), byla testována proti infekci *L. major*. Myši byly vakcinované DNA kódující jednotlivé antigeny, nebo hybridní DNA vzniklou fúzí více genů. Všechny vakcíny prokázaly částečnou ochranu myší proti umělé infekci promastigoty *L. major*, ale nejlepší výsledky byly pozorovány u skupin myší očkováných vakcínou s DNA více antigenů. Velikost léze byla redukována u myší očkováných fúzí LeIF a TSA o 46 %, u myší očkováných fúzí LeIF-LACK-TSA o 48 % a u myší očkováných fúzí LACK-TSA o 40 % oproti skupinám očkováných fyziologickým roztokem. Ve všech skupinách vyvolala vakcinace Th1 odpověď charakteristickou vyšší produkcí IFN- γ a protilátek podtřídy IgG2a ve srovnání s kontrolní skupinou. Tyto výsledky naznačují, že imunizace DNA kódující více antigenů leishmanie vyvolává silnější ochrannou imunitní odpověď a vyšší ochranu než vakcinace DNA jednotlivých antigenů. Kombinace DNA vakcín exprimujících různé antigeny s různým účinkem na imunitu recipienta může být tak využita jako vakcína s lepším účinkem proti CL (Maspi *et al.*, 2017b; Maspi *et al.*, 2017a; Maspi *et al.*, 2018).

V Íránu byla navržena také vakcína obsahující plazmidy s geny TSA a adjuvans z nanomateriálů. Jako adjuvans byl použit buď dendrimer, nebo polymethylmethakrylát (PMMA). Myši byly očkované DNA vakcínou s PMMA, dendrimerem, nebo bez adjuvantu.

Kontrolní skupiny dostaly samotný plazmid, samotný adjuvant, nebo fyziologický roztok. U všech očkováných skupin byl pozorován po infekci *L. major* snížený počet parazitů ve slezině proti kontrolním skupinám. Vakcinace vyvolala také zvýšenou produkci IFN- γ lymfocyty. Hladiny IFN- γ byly zvýšeny u skupin očkováných vakcínami s nanoadjuvanty oproti skupinám kontrolním nebo očkováných vakcínou bez adjuvans. Obě vakcíny s nanoadjuvanty způsobily větší produkci protilátek než vakcína bez adjuvans. Všechny očkované skupiny ukázaly po infekci zvýšenou produkci IgG1 izotypů ve srovnání s kontrolními skupinami. IgG2a izotypy byly více u imunizovaných skupin před i po infekci oproti kontrolám. Nanoadjuvanty zde ukázaly další možnost, jak docílit zlepšení ochrany proti CL (Tabatabaie *et al.*, 2018).

Další proteiny testované v DNA vakcínách představují histony leishmanií. Byly podány pomocí mikrožehel za účelem zjistit, jestli je tato šetrnější metoda efektivnější než klasické subkutánní a intradermální injekce. Mikrožehly byly potaženy plazmidy kódujícími histony *L. infantum* H2A, H2B, H3 a H4 a byly aplikovány myším na holou kůži. Po vakcinaci byly pozorované v séru myši IgG2a protilátky proti H2A a H4 *L. infantum*, ale žádné protilátky proti H2B ani H3. Myši, které byly očkovány pomocí mikrožehel, měly vyšší hladiny IgG2a protilátek než myši očkovány intradermálně. Myši imunizované subkutánně neměly žádné protilátky. Nebyly detekované žádné IgG1 protilátky proti histonům. Imunizace mikrožehlami také vyvolala největší imunitní odpověď určenou z kultury splenocytů vakcinovaných myši. Byl pozorován růst poměru IFN- γ /IL-13, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL10 a IFN- γ /TGF β . Dále po vakcinaci mikrožehlami vzrostla produkce iNOS a TNF- α ve srovnání se subkutánním očkováním. Po třech dávkách vakcíny podané mikrožehlami byly myši infikovány promastigoty *L. major*. Nebyla pozorována žádná ochrana, jelikož myším se vyvinula léze a měly parazity ve slezině, játrech a mízních uzlinách, stejně jako myši očkovány subkutánně plazmidem bez histonové DNA. Je proto zapotřebí dalších studií testujících očkování s větším počtem plazmidů pomocí mikrožehel (Moreno *et al.*, 2017).

Histonová DNA vakcína byla testována i v další kombinaci. Vakcína obsahovala plazmid s cDNA fúzního polyproteinu zvaného HISA70, složeného z histonů leishmanií H2A, H2B, H3, H4 a proteinů A2 a Hsp70. Takto složený polyprotein je slibným kandidátem na vakcínu proti CL způsobené více druhy leishmanií. Myši byly vakcinované polyproteinem a poté infikovány promastigoty *L. major*. Na rozdíl od kontrol imunizovaných pouze vektorem vakcíny nebo fyziologickým roztokem se u některých očkováných myši nevyvinula léze v místě inokulace a u těch, kde se vyvinula, byla menší, bez tvorby vředů nebo nekrotické tkáně. Nebyla pozorována ani visceralizace leishmanií. Myši

neměly leishmanie ve slezině a jejich množství bylo sníženo v mízních uzlinách. Buňky izolované z jejich mízních uzlin stimulovaných antigeny *L. major* produkovaly méně IL-4 a víc IFN- γ a IL-17 než neočkované myši. Byla zaznamenána i vyšší aktivita iNOS u očkovaných myší oproti neočkovaným, přitom myši očkované prázdným vektorem nevykazovaly odlišnou aktivitu iNOS než kontroly očkované fyziologickým roztokem. Co se týká humorální odpovědi, očkované myši měly nižší hladiny specifických IgG1 protilátek proti leishmaniím a průměrný poměr Th1/Th2 byl vyšší než u kontrolních skupin. Vakcína byla částečně úspěšná, protože myši zcela nechránila před infekcí, což bylo usouzeno podle přítomnosti parazitů v místě jejich inokulace (Domínguez-Bernal *et al.*, 2012).

4.2 Nový svět

Proti infekci *L. mexicana* byl testován plazmid kódující gen pro gp63. Myši byly imunizované zlatými částicemi obalenými gp63 cDNA *L. mexicana* pomocí genové pistole. Po infekci *L. mexicana* nemělo 66 % myší (4 ze 6) lézi. Byla pozorována cytotoxická T buněčná odpověď splenocytů z očkovaných myší stimulovaných gp63 a antigeny *L. mexicana*. Očkování vyvolalo i prudký nárůst IgG2a a menší růst IgG1, jejichž hladina byla podobná i u myší očkovaných samotným plazmidem, což naznačovalo, že tato odpověď je nespecifická. Vysoké hladiny IgG2a byly pravděpodobně spojeny s Th1 odpovědí a přetrvaly celou dobu experimentu (asi 40 dnů) (Ali *et al.*, 2009; Rezvan *et al.*, 2011). Tato imunizace byla efektivnější než podání vakcín intramuskulárně, kdy byly myši chráněny ve 33 % (Ali *et al.*, 2009).

Plazmid nesoucí cDNA proteinu gp63 byl testován i v kombinaci s plazmidem s cDNA nukleosid hydrolázy 36 (NH36). Křečci dostali ve dvou dávkách vakcínu spolu s adjuvantem fosforečnanem hlinitým a poté byli infikováni promastigoty *L. mexicana*. Po 17 týdnech infekce měli neočkovaní samci vyvinutou dvojnásobnou lézi v místě inokulace parazitů v porovnání se samicemi. Také na vakcinovaných křečcích se ukázalo, že samci jsou citliví k infekci, jelikož jejich léze byla stejná jako u kontrolních neočkovaných křečků. Naproti tomu u samic vakcína ukázala ochranu. Po 17 týdnech infekce měly o 63 % menší lézi než kontrolní samice očkované pouze solným roztokem nebo prázdným vektorem vakcíny (Chalé-balboa *et al.*, 2009). Tento jev zřejmě souvisí s tím, že produkci cytokinů ovlivňují pohlavní hormony očkovaného zvířete (Lezama-Dávila *et al.*, 2007). Proto je získané výsledky obtížné přenést na jiné druhy, včetně člověka. Studie zdůrazňuje, že také při vývoji lidských vakcín je třeba brát v potaz vliv pohlaví na jejich účinnost (Chalé-balboa *et al.*, 2009).

Kombinace proteinů A2 a NH (nukleosid hydrolázy) kódovaných plazmidem byla testovaná proti infekci dvěma leishmaniemi Nového světa. Myši byly očkovány DNA vakcínou kódující protein A2, NH, nebo A2 i NH. Poté byli některým inokulováni promastigoti *L. infantum* (= *L. chagasi*) a některým *L. amazonensis*. Snížení počtu *L. infantum* (= *L. chagasi*) i *L. amazonensis* ve slezině a játrech bylo pozorováno u myší očkovaných A2 DNA vakcínou a NH+A2 DNA vakcínou, ale ne u těch očkovaných NH DNA vakcínou. Redukce otoku po injekci leishmanií byla naměřena pouze u myší, které byly očkované A2 nebo NH+A2 DNA vakcínou a inokulovány *L. amazonensis*. Splenocyty odebrané z očkovaných myší před infekcí byly *in vitro* stimulovány příslušným rekombinantním proteinem (A2 nebo NH) pro vyhodnocení produkce cytokinů IFN- γ , IL-4 a IL-10. U všech očkovaných myší bylo naměřeno velké množství IFN- γ . Th1 polarizace byla nejméně výrazná u skupiny očkované NH cDNA. Po infekci *L. amazonensis* nebo *L. infantum* (= *L. chagasi*) byla u skupin očkovaných A2 nebo NH+A2 cDNA produkce IFN- γ posílena a produkce IL-4 a IL-10 potlačena, ale u skupiny očkované NH cDNA tomu tak nebylo. Údaje získané v této studii potvrzují, že pro ochranu myší proti infekci *L. infantum* (= *chagasi*) a *L. amazonensis* je potřeba vysoké hladiny INF- γ a nízké hladiny IL-4 a IL-10, čemuž by mohl také pomoci správný adjuvant. Vakcína složená z cDNA antigenů A2 a NH je potenciálním kandidátem na univerzální vakcínu proti leishmaniózám Ameriky (Zanin *et al.*, 2007).

Dvě vakcíny složené z plazmidů kódujících histony *L. infantum* (HIS), nebo ribozomální protein P0 *L. infantum* (LiP0) byly testované proti VL způsobené *L. infantum* (= *chagasi*). Byly použity dvě očkovací strategie – podání tří dávek DNA vakcíny kódující buď LiP0, nebo HIS, nebo podání dvou dávek DNA vakcíny a třetí dávky příslušného rekombinantního proteinu. První strategie vyvolala převážně buněčnou imunitní odpověď a snížení množství parazitů, zatímco při druhé strategii byly pouze v séru křečků naměřeny vysoké hladiny protilátek proti proteinům HIS a LiP0. Po vakcinaci byli křečci infikováni *L. infantum* (= *chagasi*) s homogenátem slinných žláz *Lu. longipalpis*. Obě testované molekuly byly imunogenní, ale pouze LiP0 byl efektivní pro prevenci onemocnění. Křečci imunizovaní LiP0 DNA měli snížený počet parazitů v mízních uzlinách, játrech a slezině. Tento účinek byl dlouhodobý, jelikož počet parazitů klesal do 5 měsíců po jejich inokulaci. Křečci imunizovaní dvěma dávkami LiP0 DNA následovaných dávkou rekombinantního LiP0 byli chráněni pouze krátkodobě – 2 měsíce. Tyto výsledky ukázaly, že při testování vakcín hraje důležitou roli imunizační strategie (Pereira *et al.*, 2015).

Tabulka 3: Další studované DNA vakcíny

kódované antigeny	reference
LEISHDNAVAX (KMP11, CPA, CPB, P74, TSA)	(Riede <i>et al.</i> , 2015)
KMP-11	(Guha <i>et al.</i> , 2013)
ribosomální gen P1 <i>L. donovani</i>	(Masih <i>et al.</i> , 2011)
protein disulfid izomeráza <i>L. donovani</i> (LdPDI)	(Amit <i>et al.</i> , 2017)
lipofosfoglykan 3 (LPG 3)	(Pirdel <i>et al.</i> , 2014)

5 Vakcíny obsahující slinné proteiny flebotomů

Při sání na hostiteli flebotomové aktivně vylučují do jeho těla sliny, které obsahují řadu farmakologicky aktivních molekul. V jejich přítomnosti se také usnadňuje přenos leishmanií a uchycení infekce v hostiteli. Zjistilo se, že imunizace slinami flebotoma vede k vytvoření ochranné imunity proti antigenům obsaženým ve slinách a při dalším sání nakaženého flebotoma k ochraně proti infekci. Proto je snaha tyto proteiny identifikovat a použít jako adjuvans do vakcín, nebo přímo z nich vytvořit vakcínu (shrnutí v Lestinova *et al.*, 2017).

5.1 Starý svět

U flebotomů Starého světa se testovaly zejména slinné proteiny *Phlebotomus papatasi* (Valenzuela *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2008), *Phlebotomus ariasi* (Oliveira *et al.*, 2006) a *Phlebotomus duboscqi* (Oliveira *et al.*, 2015).

Ochranná funkce proti infekci *L. major* byla zjištěna u proteinu *P. papatasi* PpSP15. Myši vakcinované plazmidy kódujícími PpSP15 byly infikované do ucha promastigoty *L. major* a homogenátem slinných žláz *P. papatasi*, aby byla napodobena přirozená infekce. Uši imunizovaných myší nesly jen malé nebo žádné známky poškození, zatímco neočkované infikované myši měly léze s vředy a poškozenou tkáň (Valenzuela *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2008). Ochranný účinek vakcíny trval minimálně 3 měsíce po imunizaci (Valenzuela *et al.*, 2001). Slinný protein PpSP15 byl dále testovaný jako DNA vakcína exprimovaný nepatogenní *Leishmania tarentolae* za přítomnosti adjuvans CpG oligodeoxynukleotidů nebo kódovaný plazmidem v kombinaci s cysteinovými proteázami leishmanií CPA a CPB exprimovanými *L. tarentolae*. V obou případech působil u myší ochranně proti CL způsobené

L. major (Zahedifard *et al.*, 2014; Katebi *et al.*, 2015). V kombinaci s cysteinovými proteázami vyvolal Th1 odpověď a produkci protilátek proti slinám flebotoma s vyšším podílem IgG2a než IgG1 (Zahedifard *et al.*, 2014). Hlavní překážkou je potřeba jistoty, že vakcína nezpůsobí nemoc a může být použita i u imunokompromitovaných pacientů. Vakcinace *L. tarentolae* exprimující antigeny leishmanií a PpSP15 by mohla být alternativou k leishmanizaci (Katebi *et al.*, 2015).

Jako vakcína proti CL se testoval i plazmid se slinným proteinem PpSP44 *P. papatasi*, ale neprokázal žádnou ochranu, a dokonce infekci zhoršil. Z toho vyplývá, že různé proteiny mění různě průběh imunity proti leishmaniím (Oliveira *et al.*, 2008).

Ochranu proti přirozené infekci *L. major* poskytl i PdSP15 *P. duboscqi*. Makakové byli imunizováni dvěma dávkami DNA vakcíny s plazmidy kódujícími PdSP15 a poté jednou dávkou rekombinantního PdSP15 s adjuvans GLA-SE (glukopyranosyl lipid ve stabilní emulzi). Imunizovaní makakové pak byli vystaveni samicím *P. duboscqi* nakaženým *L. major*. Makakové, kteří produkovali po imunizaci IFN- γ , měli redukovaný počet parazitů a velikost léze. U makaků, kteří takovou odpověď po vakcinaci neměli, nedošlo ani k ochraně proti infekci. Díky těmto výsledkům vakcíny u primátů bude snaha dále studovat její bezpečnost pro budoucí testování na lidech (Oliveira *et al.*, 2015).

5.2 Nový svět

V Novém světě se jako kandidáty na vakcínu ukázaly efektivní zejména proteiny *Lu. longipalpis*, které se testují i proti leishmaniím, které přirozeně nepřenáší. Využívá se tak pravděpodobně zkřížených reakcí mezi slinnými proteiny více druhů flebotomů (Tavares *et al.*, 2011; Wheat *et al.*, 2017; Cunha *et al.*, 2018).

Maxadilan (MAX) je jedním ze slinných proteinů *Lu. longipalpis*, který při inokulaci myším spolu s *L. major* mnohonásobně zhoršil zatížení hostitele parazity. Proto bylo zkoumáno a prokázáno, že vakcinace MAX poskytuje ochranu před infekcí *L. major*. Myši očkované MAX s Freudovým adjuvans a poté infikované *L. major* byly vysoce rezistentní k infekci. Měly 3 – 5 \times menší kožní léze a 507 \times méně parazitů než kontrolní myši očkované jen adjuvans (Morris *et al.*, 2001). V další studii byly myši očkované syntetickým MAX, nebo jeho N-koncovými či C-koncovými peptidy spolu s adjuvantní lipozomální složkou. Po dvou dávkách vakcíny jim byl inokulován nízký počet (10^2 – 10^3) promastigotů *L. major* a MAX. Všechny tři vakcíny poskytly srovnatelnou ochranu, která byla stanovená určením počtu parazitů po 18 týdnech od infekce. Stejně jako ve studii Morris *et al.*, 2001 byl v mízních

uzlinách zvýšený počet CD4+ buněk sekretujících IFN- γ a méně buněk sekretujících IL-4. Imunita vytvořená proti MAX mohla zapříčinit Th1 polarizaci při infekci, a tím pomoci ke zničení leishmanií. Výsledky ukázaly, že je možné místo celého proteinu MAX použít jen jeho části, a tak zjednodušit výrobní proces vakcíny. Vakcína by mohla být účinnou ochranou proti infekci bez dalších antigenů z leishmanií. Pro každý geneticky izolovaný druh flebotoma by se ale musela vyvinout vlastní slinná vakcína (Wheat *et al.*, 2017).

Vakcína první generace složená z antigenů *Leishmania braziliensis*, saponinu jako adjuvans a výtažku ze slinných žláz *Lu. longipalpis* (LBSapSal) byla zkoumaná jako kandidát na ochranu psů proti VL způsobené *L. infantum* (= *chagasi*). Psi byli očkováni třemi dávkami vakcíny a poté infikováni promastigoty *L. infantum* (= *chagasi*) spolu s výtažkem ze slinných žláz *Lu. longipalpis*. Po 885 dnech bylo naměřeno snížení počtu parazitů ve slezině ve skupině očkové LBSapSal o 69-79 % a ve skupině očkové LBSal, tj. stejnou vakcínou bez saponinu, o 60-67 % na rozdíl od neočkovaných kontrolních psů (Aguiar-Soares *et al.*, 2014; Resende *et al.*, 2016). Ve studii Resende *et al.*, 2016 vakcinace vedla k Th1 polarizaci, která byla zjištěna zvýšenou hladinou cytokinů TNF- α , IL-12 a IFN- γ a sníženou hladinou Th2 cytokinů IL-4 a TGF- β v kultuře PBMCs. Ustanovení Th1 polarizace bylo podpořeno i zvýšenou produkcí NO, která měla za následek redukci parazitismu. Ve studii Aguiar-Soares *et al.*, 2014 byly v séru psů zjištěny vysoké úrovně celkových IgG protilátek, i jejich subtypů IgG1 a IgG2. Také byla pozorovaná expanze CD5+, CD4+ a CD8+ T lymfocytů cirkulujících v krvi (Aguiar-Soares *et al.*, 2014). Z těchto výsledků je patrné, že vakcína kombinující slinné proteiny a antigeny leishmanií účinkovala dlouhou dobu po infekci a má potenciál jako ochrana před infekcí *L. infantum* (= *chagasi*) (Aguiar-Soares *et al.*, 2014; Resende *et al.*, 2016).

Dalším proteinem ze slin *Lu. longipalpis*, který má potenciální využití v prevenci proti leishmanióze je LJM19, jinak zvaný SALO (Salivary Anti-complement from *Lu. longipalpis*) (Ferreira *et al.*, 2016). Křečci byli imunizováni DNA vakcínou s plazmidy kódujícími LJM19 a poté infikováni *L. infantum* (= *chagasi*) a homogenátem slinných žláz *Lu. longipalpis*. Byli chráněni 8 měsíců, neměli klinické známky VL a měli nižší počet parazitů v játrech a slezině. Kontrolní křečci imunizovaní prázdným DNA vektorem měli už po 5 měsících progresivní VL (Gomes *et al.*, 2008). Předchozí výsledky se potvrdily i ve studii, kde byli křečci imunizováni plazmidy kódujícími KMP11 a LJM19 a infikováni *L. infantum* (= *chagasi*) spolu se sonikátem slinných žláz *Lu. longipalpis*. Očkovaní křečci měli 5 měsíců po infekci redukovaný počet parazitů ve slezině a játrech, a navíc bylo zjištěno, že měli normální hematologický profil. Neočkovaní křečci měli touto dobou anémii. Očkovaní kombinací KMP11 a LJM19 ale nevedlo ke zvýšení ochranného účinku vakcíny obsahující pouze KMP11 (da Silva *et al.*, 2011).

Ve studii Fiuza *et al.*, 2016 byli křečci intradermálně imunizováni rekombinantním LJM19 v první dávce a LJM19 s *L. donovani* atenuovanou delecí genu pro centrin ve druhé dávce. Očkování vedlo k ochraně proti infekci *L. donovani*, která byla srovnatelná s nitrosrdečním očkováním samotné atenuované *L. donovani*. V obou případech bylo 9 měsíců po infekci pozorováno snížení počtu parazitů v mízních uzlinách, slezině i játrech, na rozdíl od neočkovaných křečků, a nebyl zjištěn žádný zánět ve slezině (Fiuza *et al.*, 2016). Vakcína obsahující plazmidy kódující LJM19 byla testována i jako ochrana proti *L. braziliensis*. Očkování křečci byli infikováni *L. braziliensis* v přítomnosti sonikátu slinných žláz buď *Lu. longipalpis*, nebo *Lu. intermedia*. V obou případech měli oproti kontrolním křečkům imunizovaným fyziologickým roztokem zmenšenou velikost léze s redukováným počtem parazitů v jejím místě i v mízních uzlinách. Ochrana byla v prvním případě doprovázená poklesem IL-10 a TGF- β a v druhém případě navíc zvýšenou expresí IFN- γ . Tato studie naznačila možnou zkříženou reaktivitu mezi slinami *Lu. longipalpis* a *Lu. intermedia*, která může být využita při vakcinaci proti infekci *L. braziliensis* a jejímu přirozenému přenašeči *Lu. intermedia* (Tavares *et al.*, 2011).

Další hojný slinný protein *Lu. longipalpis*, LJM11 (yellow-related protein), byl zkoumán jako další možný kandidát na vakcínu. Očkování křečků plazmidy s LJM11 vedlo k ochraně trvající 2 měsíce proti infekci *L. infantum* (=chagasi) a homogenátem slinných žláz *Lu. longipalpis* (Gomes *et al.*, 2008). Myši imunizované plazmidy kódujícími LJM11 byly chráněny 12 týdnů proti infekci *L. major* s homogenátem slinných žláz *Lu. longipalpis* (Xu *et al.*, 2011). Ochrana byla pozorována i u myši očkovaných atenuovanou bakterií *Listeria monocytogenes*, která expimovala LJM11. Myši infikované 3 týdny po vakcinaci *L. major* s homogenátem slinných žláz *Lu. longipalpis* byly chráněny 6 týdnů po infekci. Myši vystavené infikovaným *Lu. longipalpis* 12 týdnů po vakcinaci byly chráněny před příznaky CL, ale počet parazitů měly srovnatelný jako myši očkované prázdňným vektorem (Abi Abdallah *et al.*, 2014). Lepší výsledky měla imunizace myši rekombinantním LJM11 a infekce pomocí *Lu. longipalpis* nakažených *L. major*. I když byly myši infikované 5 měsíců po imunizaci, jejich imunologická paměť byla stále dostatečná na to, aby je ochránila před infekcí (Gomes *et al.*, 2012). Rekombinantní LJM11 poskytl ochranu až 10 týdnů i proti infekci *L. braziliensis* se sonikátem slinných žláz *Lu. longipalpis*. Při infekci očkovaných myši *L. braziliensis* a sonikátem slinných žláz *Lu. intermedia* nebyl počet parazitů pod kontrolou, vedlo to ale ke zpoždění vývoje léze. Je možné, že LJM11 je specifický pro *Lu. longipalpis*. Proto je potřeba najít slinné proteiny pro účely vakcinace, které jsou specifické pro více druhů flebotomů, zejména v oblastech, kde stejný druh leishmanií přenáší více druhů flebotomů (Cunha *et al.*, 2018)

Slibným kandidátem na vakcínu proti lidské VL je protein *Lu. longipalpis* LJJ143 (lufaxin-like protein). Spolu s adjuvans GLA-SE a antigeny leishmanií KMP-11 a Leish-F3+ byl naklonovaný do viru podobných částic (virus-like particles). Vakcinací myši jednou dávkou vakcíny obsahující LJJ143 a poté jednou dávkou obsahující všechny tři antigeny bylo docíleno zvýšení imunitní odpovědi na antigeny odvozené z leishmanií (KMP-11 a Leish-F3+). Tato studie také naznačila možnou zkříženou reaktivitu proteinu LJJ143 a jeho homologu PpeSP06 u druhu *Phlebotomus perniciosus*, hlavního přenašeče VL v oblasti okolo středomořského moře. Vakcína by tak mohla ochránit proti VL přenášené více druhy flebotomů (Cecílio *et al.*, 2017).

6 Závěr

V této práci jsem představila souhrn recentních studií, které se zabývaly vývojem vakcín proti leishmaniózám. Přehled nejdůležitějších vakcín je uveden v Tabulce 4.

Vakcíny první generace nesou určitá rizika spojena s nedostatkem bezpečnosti. Jejich použití je nevhodné především v případě imunokompromitovaných osob. Elegantním metodou se zdají být genetické atenuace, protože na rozdíl od fyzikálního či chemického oslabení leishmanií vedou k menší ztrátě antigenicity. Ani ty ale nemůžou zaručit úplnou ztrátu virulence leishmanií. Proto je potřeba pečlivě prozkoumat jejich bezpečnost. Další alternativou by mohly být vakcíny obsahující živé nepatogenní nebo atenuované organismy, které slouží jako vektory leishmaniální DNA. Testované byly bakterie *Lactococcus lactis*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium* a nepatogenní *L. tarentolae* (shrnuto v Saljoughian *et al.*, 2014). Řada vakcín druhé a třetí generace ukazuje dobrou ochranu. Jejich účinek může být zesílen použitím vhodného adjuvans (Tabatabaie *et al.*, 2018) a kombinací více antigenů leishmanií (Zanin *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2016; Fernández Cotrina *et al.*, 2018; Maspi *et al.*, 2018). Řada studií se již snaží napodobit věrněji přirozenou infekci přidáním slin flebotomů do vakcín, které zároveň i omezují možnost přežití leishmanií (Zahedifard *et al.*, 2014; Resende *et al.*, 2016; Cecílio *et al.*, 2017).

Přesto, že je téma vakcín proti leishmaniózám hojně studováno, nejsou stále registrované žádné lidské vakcíny. Dvě vakcíny, LEISH-F1 a LEISH-F2, se dostaly do klinického testování, a to do druhé fáze. Ze zvířecích vakcín jsou již registrovány tři vakcíny, Leish-Tec® v Brazílii a CaniLeish® a LetiFend® v Evropské unii (Thomaz-Soccol *et al.*, 2017; Fernández Cotrina *et al.*, 2018).

Tabulka 4: Přehled nejdůležitějších vakcín

zařazení	antigen nebo název vakcíny	proti čemu	ochrana	strana
první generace, Starý svět	<i>L. donovani</i> oslabené γ -zářením	<i>L. donovani</i>	částečná	3
první generace, Starý svět	<i>L. donovani</i> oslabené delecí genu pro FBP	<i>L. donovani</i>	ano	4
první generace, Starý svět	<i>L. infantum</i> oslabená gentamicinem	<i>L. infantum</i>	ano	5
první generace, Nový svět	Leishvacin® obsahující mrtvé <i>L. amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	částečná	6
první generace, Nový svět	mrtvé <i>L. amazonensis</i> a adjuvans CAF01	<i>L. infantum</i> (=chagasi)	ano	8
druhá generace, Starý svět	LetiFend®	<i>L. infantum</i>	ano	9
druhá generace, Starý svět	LEISH-F1	<i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. infantum</i>	částečná	11
druhá generace, Nový svět	Leish-Tec®	<i>L. infantum</i> (=chagasi), <i>L. amazonensis</i> , <i>L. donovani</i>	částečná	14
třetí generace, Starý svět	gp63, Hsp70	<i>L. donovani</i>	ano	16
třetí generace, Starý svět	LeIF, LACK, TSA	<i>L. major</i>	částečná	16
třetí generace, Starý svět	histony	<i>L. major</i>	ne	17
třetí generace, Nový svět	LiP0	<i>L. infantum</i> (=chagasi)	ano	19
slinné proteiny, Starý svět	PpSP15	<i>L. major</i>	ano	20
slinné proteiny, Nový svět	Maxadilan a freudovo adjuvans	<i>L. major</i>	ano	21

7 Seznam literatury

7.1 Primární citace

Abi Abdallah, D. S. *et al.* (2014) 'A *Listeria monocytogenes*-based vaccine that secretes sand fly salivary protein LJM11 confers long-term protection against vector-transmitted *Leishmania major*.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 82(7), pp. 2736–45. doi: 10.1128/IAI.01633-14.

Aguiar-Soares, R. *et al.* (2014) 'LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4+ and CD8+) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*', *Parasites & Vectors*. BioMed Central, 7(1), p. 61. doi: 10.1186/1756-3305-7-61.

Ali, S. A. *et al.* (2009) 'CTL responses to *Leishmania mexicana* gp63-cDNA vaccine in a murine model', *Parasite Immunology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 31(7), pp. 373–383. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01111.x.

Almeida, A. P. M. M. *et al.* (2018) 'New Vaccine Formulations Containing a Modified Version of the Amastigote 2 Antigen and the Non-Virulent *Trypanosoma cruzi* CL-14 Strain Are Highly Antigenic and Protective against *Leishmania infantum* Challenge', *Frontiers in Immunology*. Frontiers, 9, p. 465. doi: 10.3389/fimmu.2018.00465.

Alvar, J. *et al.* (2013) 'Case study for a vaccine against leishmaniasis', *Vaccine*. Elsevier, 31, pp. B244–B249. doi: 10.1016/J.VACCINE.2012.11.080.

Amit, A. *et al.* (2017) 'Immunization with *Leishmania donovani* protein disulfide isomerase DNA construct induces Th1 and Th17 dependent immune response and protection against experimental visceral leishmaniasis in Balb/c mice', *Molecular Immunology*. Pergamon, 82, pp. 104–113. doi: 10.1016/J.MOLIMM.2016.12.022.

Avishek, K. *et al.* (2016) 'Gene deleted live attenuated *Leishmania* vaccine candidates against visceral leishmaniasis elicit pro-inflammatory cytokines response in human PBMCs', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 33059. doi: 10.1038/srep33059.

Bertholet, S. *et al.* (2009) 'Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis.', *Vaccine*. NIH Public Access, 27(50), pp. 7036–45. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.09.066.

Borja-Cabrera, G. . *et al.* (2002) 'Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN)', *Vaccine*. Elsevier, 20(27–28), pp. 3277–3284. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00294-3.

Borja-Cabrera, G. P. *et al.* (2008) 'Immunogenicity assay of the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil', *Vaccine*. Elsevier, 26(39), pp. 4991–4997. doi: 10.1016/J.VACCINE.2008.07.029.

Brianti, E. *et al.* (2016) 'Field Evaluation of Two Different Treatment Approaches and Their Ability to Control Fleas and Prevent Canine Leishmaniosis in a Highly Endemic Area', *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by G. Baneth. Public Library of Science, 10(9), p. e0004987. doi: 10.1371/journal.pntd.0004987.

Bruhn, K. W. *et al.* (2012) 'Killed but metabolically active *Leishmania infantum* as a novel whole-cell vaccine for visceral leishmaniasis.', *Clinical and vaccine immunology: CVI*. American Society for Microbiology (ASM), 19(4), pp. 490–8. doi: 10.1128/CVI.05660-11.

Campos-Neto, A. *et al.* (2001) 'Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology, 69(6), pp. 4103–8. doi: 10.1128/IAI.69.6.4103-4108.2001.

- Carcelén, J. *et al.* (2009) 'The Chimerical Multi-Component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection', *Vaccine*. Elsevier, 27(43), pp. 5964–5973. doi: 10.1016/J.VACCINE.2009.07.069.
- Carneiro, M. B. H. *et al.* (2014) 'Short-term protection conferred by Leishvacin® against experimental *Leishmania amazonensis* infection in C57BL/6 mice', *Parasitology International*. Elsevier, 63(6), pp. 826–834. doi: 10.1016/J.PARINT.2014.07.010.
- Carvalho, F. A. A. *et al.* (2002) 'Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Elsevier, 43(4), pp. 289–295. doi: 10.1016/S0732-8893(02)00410-8.
- Cecílio, P. *et al.* (2017) 'Pre-clinical antigenicity studies of an innovative multivalent vaccine for human visceral leishmaniasis.', *PLoS neglected tropical diseases*. Public Library of Science, 11(11), p. e0005951. doi: 10.1371/journal.pntd.0005951.
- Coelho, E. A. F. *et al.* (2003) 'Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology, 71(7), pp. 3988–94. doi: 10.1128/IAI.71.7.3988-3994.2003.
- Coler, R. N. *et al.* (2002) 'Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania* major stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 70(8), pp. 4215–25. doi: 10.1128/IAI.70.8.4215-4225.2002.
- Coler, R. N. *et al.* (2007) 'Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology, 75(9), pp. 4648–54. doi: 10.1128/IAI.00394-07.
- Coler, R. N. *et al.* (2015) 'From mouse to man: safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE.', *Clinical & translational immunology*. Wiley-Blackwell, 4(4), p. e35. doi: 10.1038/cti.2015.6.
- Cunha, J. M. *et al.* (2018) 'Immunization with LJM11 salivary protein protects against infection with *Leishmania braziliensis* in the presence of *Lutzomyia longipalpis* saliva', *Acta Tropica*. Elsevier, 177, pp. 164–170. doi: 10.1016/J.ACTATROPICA.2017.10.009.
- Daneshvar, H. *et al.* (2014) 'Gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* vaccine: protection of dogs against canine visceral leishmaniosis in endemic area of southeast of Iran.', *PLoS neglected tropical diseases*. Public Library of Science, 8(4), p. e2757. doi: 10.1371/journal.pntd.0002757.
- Datta, S., Adak, R., *et al.* (2012) 'Radio-attenuated leishmanial parasites as immunoprophylactic agent against experimental murine visceral leishmaniasis', *Experimental Parasitology*. Academic Press, 130(1), pp. 39–47. doi: 10.1016/J.EXPPARA.2011.10.001.
- Datta, S., Manna, M., *et al.* (2012) 'Therapeutic immunization with radio-attenuated *Leishmania* parasites through i.m. route revealed protection against the experimental murine visceral leishmaniasis', *Parasitology Research*. Springer-Verlag, 111(1), pp. 361–369. doi: 10.1007/s00436-012-2847-4.
- Datta, S. *et al.* (2016) 'Evaluation of s.c. route of immunization by homologous radio attenuated live vaccine in experimental murine model of visceral leishmaniasis.', *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology*. Springer, 40(2), pp. 436–43. doi: 10.1007/s12639-014-0522-7.
- Datta, S., Roy, S. and Manna, M. (2015) 'Therapy with radio-attenuated vaccine in experimental murine visceral leishmaniasis showed enhanced T cell and inducible nitric oxide synthase levels, suppressed tumor growth factor-beta production with higher expression of some signaling molecules', *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. Elsevier, 19(1), pp. 36–42. doi: 10.1016/J.BJID.2014.10.009.

- Dey, R. *et al.* (2010) ‘Characterization of a *Leishmania* stage-specific mitochondrial membrane protein that enhances the activity of cytochrome c oxidase and its role in virulence’, *Molecular Microbiology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 77(2), pp. 399–414. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07214.x.
- Domínguez-Bernal, G. *et al.* (2012) ‘Mitigating an undesirable immune response of inherent susceptibility to cutaneous leishmaniasis in a mouse model: the role of the pathoantigenic HISA70 DNA vaccine.’, *Veterinary research*. BioMed Central, 43(1), p. 59. doi: 10.1186/1297-9716-43-59.
- Fernandes, A. P. *et al.* (2008) ‘Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein’, *Vaccine*. Elsevier, 26(46), pp. 5888–5895. doi: 10.1016/J.VACCINE.2008.05.095.
- Fernandes, C. B. *et al.* (2014) ‘Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis’, *Vaccine*. Elsevier, 32(11), pp. 1287–1295. doi: 10.1016/J.VACCINE.2013.12.046.
- Fernández Cotrina, J. *et al.* (2018) ‘A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniasis’, *Vaccine*. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.02.111.
- Ferreira, V. P. *et al.* (2016) ‘SALO, a novel classical pathway complement inhibitor from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 19300. doi: 10.1038/srep19300.
- Firouzmand, H. *et al.* (2017) ‘The role of LPD-nanoparticles containing recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) in protection against leishmaniasis in murine model’, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. Taylor & Francis, pp. 1–11. doi: 10.1080/08923973.2017.1407941.
- Fiuza, J. A. *et al.* (2016) ‘Intradermal Immunization of *Leishmania donovani* Centrin Knock-Out Parasites in Combination with Salivary Protein LJM19 from Sand Fly Vector Induces a Durable Protective Immune Response in Hamsters’, *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by E. Ghedin. Public Library of Science, 10(1), p. e0004322. doi: 10.1371/journal.pntd.0004322.
- Ghosh, A., Zhang, W. W. and Matlashewski, G. (2001) ‘Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections’, *Vaccine*. Elsevier, 20(1–2), pp. 59–66. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00322-X.
- Gillespie, P. M. *et al.* (2016) ‘Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis’, *Vaccine*. Elsevier, 34(26), pp. 2992–2995. doi: 10.1016/J.VACCINE.2015.12.071.
- Gomes, R. *et al.* (2008) ‘Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 105(22), pp. 7845–50. doi: 10.1073/pnas.0712153105.
- Gomes, R. *et al.* (2012) ‘Immunity to sand fly salivary protein LJM11 modulates host response to vector-transmitted leishmania conferring ulcer-free protection.’, *The Journal of investigative dermatology*. Elsevier, 132(12), pp. 2735–43. doi: 10.1038/jid.2012.205.
- Gradoni, L. *et al.* (2005) ‘Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals’, *Vaccine*. Elsevier, 23(45), pp. 5245–5251. doi: 10.1016/J.VACCINE.2005.07.001.
- Grimaldi, G. *et al.* (2017) ‘Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates.’, *PloS one*. Public Library of Science, 12(9), p. e0185438. doi: 10.1371/journal.pone.0185438.
- Guha, R. *et al.* (2013) ‘Heterologous priming–boosting with DNA and vaccinia virus expressing kinetoplastid membrane protein-11 induces potent cellular immune response and confers protection against infection with antimony resistant and sensitive strains of *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani*’,

Vaccine. Elsevier, 31(15), pp. 1905–1915. doi: 10.1016/J.VACCINE.2013.02.025.

Harrus, S. *et al.* (2003) ‘Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*’, *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Elsevier, 96(3–4), pp. 239–243. doi: 10.1016/J.VETIMM.2003.08.005.

Chakravarty, J. *et al.* (2011) ‘A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1 + MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis’, *Vaccine*. Elsevier, 29(19), pp. 3531–3537. doi: 10.1016/J.VACCINE.2011.02.096.

Chalé-balboa, W. G. *et al.* (2009) ‘A combination DNA vaccine encoding nucleoside hydrolase 36 and glycoproteine 63 protects female but not male hamsters against *Leishmania mexicana*’, *Parasite*. EDP Sciences, 16(3), pp. 227–230. doi: 10.1051/parasite/2009163227.

Charest, H. and Matlashewski, G. (1994) ‘Developmental Gene Expression in *Leishmania donovani*: Differential Cloning and Analysis of an Amastigote-Stage- Specific Gene’, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 14(5), pp. 2975–2984. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358665/pdf/molcellb00005-0147.pdf> (Accessed: 27 March 2018).

Chaudhary, R. *et al.* (2014) ‘Immunomodulation in human dendritic cells leads to induction of interferon-gamma production by *Leishmania donovani* derived KMP-11 antigen via activation of NF- κ B in Indian kala-azar patients.’, *BioMed research international*. Hindawi, 2014, p. 947606. doi: 10.1155/2014/947606.

Ismail, N. *et al.* (2017) ‘Immunization with Live Attenuated *Leishmania donovani* Centrin^{-/-} Parasites Is Efficacious in Asymptomatic Infection’, *Frontiers in Immunology*. Frontiers, 8, p. 1788. doi: 10.3389/fimmu.2017.01788.

Jafari, I. *et al.* (2018) ‘Cationic liposomes formulated with a novel whole *Leishmania* lysate (WLL) as a vaccine for leishmaniasis in murine model’, *Immunobiology*. Urban & Fischer, 223(6–7), pp. 493–500. doi: 10.1016/J.IMBIO.2017.12.003.

Jain, K. and Jain, N. K. (2015) ‘Vaccines for visceral leishmaniasis: A review’, *Journal of Immunological Methods*. Elsevier, 422, pp. 1–12. doi: 10.1016/J.JIM.2015.03.017.

Katebi, A. *et al.* (2015) ‘*Leishmania tarentolae* secreting the sand fly salivary antigen PpSP15 confers protection against *Leishmania major* infection in a susceptible BALB/c mice model’, *Molecular Immunology*. Pergamon, 67(2), pp. 501–511. doi: 10.1016/J.MOLIMM.2015.08.001.

Kaur, S., Kaur, T. and Joshi, J. (2016) ‘Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccine against visceral leishmaniasis in BALB/c mice.’, *Journal of biomedical research*. Education Department of Jiangsu Province, 30(4), pp. 304–13. doi: 10.7555/JBR.30.20150125.

Kaur, T., Sobti, R. C. and Kaur, S. (2011) ‘Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice’, *Parasite Immunology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 33(2), pp. 95–103. doi: 10.1111/j.1365-3024.2010.01253.x.

Khamesipour, A. *et al.* (2005) ‘Leishmanization: Use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis’, *Vaccine*. Elsevier, 23(28), pp. 3642–3648. doi: 10.1016/J.VACCINE.2005.02.015.

Khamesipour, A. *et al.* (2006) ‘Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview.’, *The Indian journal of medical research*, 123(3), pp. 423–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778321> (Accessed: 28 March 2018).

Kumar, A. and Samant, M. (2016) ‘DNA vaccine against visceral leishmaniasis: A promising approach for prevention and control’, *Parasite Immunology*, 38(5), pp. 273–281. doi: 10.1111/pim.12315.

Leal, J. M. *et al.* (2015) ‘Intranasal vaccination with killed *Leishmania amazonensis* promastigotes

- antigen (LaAg) associated with CAF01 adjuvant induces partial protection in BALB/c mice challenged with *Leishmania (infantum) chagasi*.', *Parasitology*, 142(13), pp. 1640–1646. doi: 10.1017/S0031182015001250.
- Lestinova, T. *et al.* (2017) 'Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), pp. 1–26. doi: 10.1371/journal.pntd.0005600.
- Lezama-Dávila, C. M. *et al.* (2007) '17Beta-estradiol increases *Leishmania mexicana* killing in macrophages from DBA/2 mice by enhancing production of nitric oxide but not pro-inflammatory cytokines.', *The American journal of tropical medicine and hygiene*. NIH Public Access, 76(6), pp. 1125–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17556622> (Accessed: 19 April 2018).
- Llanos-Cuentas, A. *et al.* (2010) 'A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1 + MPL-SE vaccine when used in combination with sodium stibogluconate for the treatment of mucosal leishmaniasis', *Vaccine*. Elsevier, 28(46), pp. 7427–7435. doi: 10.1016/J.VACCINE.2010.08.092.
- Marcondes, M. *et al.* (2011) 'Temporal IgG subclasses response in dogs following vaccination against *Leishmania* with Leishmune®', *Veterinary Parasitology*. Elsevier, 181(2–4), pp. 153–159. doi: 10.1016/J.VETPAR.2011.04.004.
- Marcondes, M. *et al.* (2013) 'Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®', *Veterinary Parasitology*. Elsevier, 197(3–4), pp. 649–652. doi: 10.1016/J.VETPAR.2013.07.013.
- Martin, V. *et al.* (2014) 'The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later', *Veterinary Research*. BioMed Central, 45(1), p. 69. doi: 10.1186/1297-9716-45-69.
- Masih, S., Arora, S. K. and Vasishta, R. K. (2011) 'Efficacy of *Leishmania donovani* ribosomal P1 gene as DNA vaccine in experimental visceral leishmaniasis', *Experimental Parasitology*. Academic Press, 129(1), pp. 55–64. doi: 10.1016/J.EXPPARA.2011.05.014.
- Maspi, N., Ghaffarifar, F., Sharifi, Z., Dalimi, A. and Zahra Khademi, S. (2017) 'DNA vaccination with a plasmid encoding LACK-TSA fusion against *Leishmania* major infection in BALB/c mice', *Malaysian J Pathol*, 39(3), pp. 267–275. Available at: <http://www.mjpath.org.my/2017/v39n3/DNA-vaccination.pdf> (Accessed: 15 April 2018).
- Maspi, N., Ghaffarifar, F., Sharifi, Z., Dalimi, A. and Dayer, M. S. (2017) 'Immunogenicity and efficacy of a bivalent DNA vaccine containing LeIF and TSA genes against murine cutaneous leishmaniasis', *APMIS*. Wiley/Blackwell (10.1111), 125(3), pp. 249–258. doi: 10.1111/apm.12651.
- Maspi, N. *et al.* (2018) 'Comparative Assessment of Induced Immune Responses Following Intramuscular Immunization with Fusion and Cocktail of LeIF, LACK and TSA Genes Against Cutaneous Leishmaniasis in BALB/c Mice', *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. Springer International Publishing, 66(1), pp. 55–64. doi: 10.1007/s00005-017-0484-4.
- Mayrink, W. *et al.* (2002) 'Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous leishmaniasis using killed promastigotes of different strains and species of *Leishmania*', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. SBMT, 35(2), pp. 125–132. doi: 10.1590/S0037-86822002000200001.
- Mendonça, S. C. F. (2016) 'Differences in immune responses against *Leishmania* induced by infection and by immunization with killed parasite antigen: implications for vaccine discovery.', *Parasites & vectors*. BioMed Central, 9(1), p. 492. doi: 10.1186/s13071-016-1777-x.
- Molano, I. *et al.* (2003) 'A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*', *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Elsevier, 92(1–2), pp. 1–13. doi: 10.1016/S0165-2427(02)00315-X.

- Moreira, M. L. *et al.* (2016) ‘Vaccination against canine leishmaniosis increases the phagocytic activity, nitric oxide production and expression of cell activation/migration molecules in neutrophils and monocytes’, *Veterinary Parasitology*. Elsevier, 220, pp. 33–45. doi: 10.1016/J.VETPAR.2016.02.009.
- Moreno, E. *et al.* (2017) ‘Skin vaccination using microneedles coated with a plasmid DNA cocktail encoding nucleosomal histones of *Leishmania* spp.’, *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier, 533(1), pp. 236–244. doi: 10.1016/J.IJP.2017.09.055.
- Moreno, J. *et al.* (2012) ‘Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Edited by C. R. Engwerda. Public Library of Science, 6(6), p. e1683. doi: 10.1371/journal.pntd.0001683.
- Moreno, J. *et al.* (2014) ‘Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later’, *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Elsevier, 158(3–4), pp. 199–207. doi: 10.1016/J.VETIMM.2014.01.011.
- Morris, R. V *et al.* (2001) ‘Sandfly Maxadilan Exacerbates Infection Sandfly Maxadilan Exacerbates Infection with *Leishmania major* and Vaccinating Against It Protects Against *L. major* Infection 1’, *The Journal of Immunology*, 167, pp. 5226–5230. doi: 10.4049/jimmunol.167.9.5226.
- Naderer, T. *et al.* (2006) ‘Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 103(14), pp. 5502–7. doi: 10.1073/pnas.0509196103.
- Nascimento, E. *et al.* (2010) ‘A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1 + MPL-SE vaccine when used in combination with meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis’, *Vaccine*. Elsevier, 28(40), pp. 6581–6587. doi: 10.1016/J.VACCINE.2010.07.063.
- Noazin, S. *et al.* (2008) ‘First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials’, *Vaccine*. Elsevier, 26(52), pp. 6759–6767. doi: 10.1016/J.VACCINE.2008.09.085.
- Nogueira, F. S. *et al.* (2005) ‘Leishmune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs’, *Vaccine*. Elsevier, 23(40), pp. 4805–4810. doi: 10.1016/J.VACCINE.2005.05.011.
- Oliva, G. *et al.* (2014) ‘A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naïve Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum* Transmission Seasons’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Edited by S. Kamhawi. Public Library of Science, 8(10), p. e3213. doi: 10.1371/journal.pntd.0003213.
- Oliveira, F. *et al.* (2006) ‘From transcriptome to immunome: Identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library’, *Vaccine*. Elsevier, 24(3), pp. 374–390. doi: 10.1016/J.VACCINE.2005.07.085.
- Oliveira, F. *et al.* (2008) ‘Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-*Leishmania* Immune Response towards Protection or Exacerbation of Disease’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Edited by M. J. Lehane. Public Library of Science, 2(4), p. e226. doi: 10.1371/journal.pntd.0000226.
- Oliveira, F. *et al.* (2015) ‘A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates’, *Science Translational Medicine*, 7(290). doi: 10.1126/scitranslmed.aaa3043.
- Palatnik-de-Sousa, C. B., Dutra, H. S. and Borojevic, R. (1993) ‘*Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the fucose-mannose ligand (FML).’, *Acta tropica*, 53(1), pp. 59–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8096110> (Accessed: 24 February 2018).
- Palatnik, C. B. *et al.* (1989) ‘Inhibition of *Leishmania donovani* Promastigote Internalization into

Murine Macrophages by Chemically Defined Parasite Glycoconjugate Ligands', *INFECTION AND IMMUNITY*, 57(3), pp. 754–763. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC313173/pdf/iai00063-0104.pdf> (Accessed: 27 February 2018).

Paraguai de Souza, E. *et al.* (2001) 'Vaccination of Balb/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*', *Vaccine*. Elsevier, 19(23–24), pp. 3104–3115. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00031-7.

Parody, N. *et al.* (2004) 'Adjuvant guided polarization of the immune humoral response against a protective multicomponent antigenic protein (Q) from *Leishmania infantum*. A CpG + Q mix protects Balb/c mice from infection', *Parasite Immunology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 26(6–7), pp. 283–293. doi: 10.1111/j.0141-9838.2004.00711.x.

Parra, L. E. *et al.* (2007) 'Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil', *Vaccine*. Elsevier, 25(12), pp. 2180–2186. doi: 10.1016/J.VACCINE.2006.11.057.

Pereira, L. *et al.* (2015) 'Vaccination with *Leishmania infantum* Acidic Ribosomal P0 but Not with Nucleosomal Histones Proteins Controls *Leishmania infantum* Infection in Hamsters', *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by H. Louzir. Public Library of Science, 9(2), p. e0003490. doi: 10.1371/journal.pntd.0003490.

Pirdel, L., Zavarán Hosseini, A. and Rasouli, M. (2014) 'Immune response in susceptible BALB/c mice immunized with DNA encoding Lipophosphoglycan 3 of *Leishmania infantum*', *Parasite Immunology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 36(12), pp. 700–707. doi: 10.1111/pim.12147.

Regina-Silva, S. *et al.* (2016) 'Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil', *Vaccine*. Elsevier, 34(19), pp. 2233–2239. doi: 10.1016/J.VACCINE.2016.03.019.

Reguera, R. M. *et al.* (2016) 'Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis', *Veterinary Parasitology*. Elsevier, 227, pp. 98–114. doi: 10.1016/J.VETPAR.2016.07.011.

Resende, L. A. *et al.* (2016) 'Impact of LbSapSal Vaccine in Canine Immunological and Parasitological Features before and after *Leishmania chagasi*-Challenge', *PLOS ONE*. Edited by S. Rafati. Public Library of Science, 11(8), p. e0161169. doi: 10.1371/journal.pone.0161169.

Rezvan, H., Rees, R. and Ali, S. (2011) 'Leishmania mexicana Gp63 cDNA Using Gene Gun Induced Higher Immunity to *L. mexicana* Infection Compared to Soluble *Leishmania* Antigen in BALB/C.', *Iranian journal of parasitology*. Tehran University of Medical Sciences, 6(4), pp. 60–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347315> (Accessed: 15 April 2018).

Riede, O. *et al.* (2015) 'Preclinical safety and tolerability of a repeatedly administered human leishmaniasis DNA vaccine', *Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 22(8), pp. 628–635. doi: 10.1038/gt.2015.35.

Rossi, M. and Fasel, N. (2017) 'How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!', *International Immunology*, 30(3), pp. 103–111. doi: 10.1093/intimm/dxx075.

Saini, S. *et al.* (2018) 'Reduced pathogenicity of fructose-1,6-bisphosphatase deficient *Leishmania donovani* and its use as an attenuated strain to induce protective immunogenicity', *Vaccine*. Elsevier, 36(9), pp. 1190–1202. doi: 10.1016/J.VACCINE.2018.01.032.

Saljoughian, N., Taheri, T. and Rafati, S. (2014) 'Live vaccination tactics: Possible approaches for controlling visceral leishmaniasis', *Frontiers in Immunology*, 5(MAR), pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2014.00134.

Saraiva, E. M. *et al.* (2006) 'The FML-vaccine (Leishmune®) against canine visceral leishmaniasis: A transmission blocking vaccine', *Vaccine*. Elsevier, 24(13), pp. 2423–2431. doi:

10.1016/J.VACCINE.2005.11.061.

Selvapandiyan, A. *et al.* (2004) 'Centrin gene disruption impairs stage-specific basal body duplication and cell cycle progression in *Leishmania*.' , *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 279(24), pp. 25703–10. doi: 10.1074/jbc.M402794200.

Sheets, R. L. *et al.* (2006) 'Biodistribution of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar, without integration, despite differing plasmid backbones or gene inserts.' , *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. NIH Public Access, 91(2), pp. 610–9. doi: 10.1093/toxsci/kfj169.

da Silva, R. A. A. *et al.* (2011) 'DNA vaccination with KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis.' , *Acta tropica*. NIH Public Access, 120(3), pp. 185–90. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.08.007.

da Silva, V. O. *et al.* (2000) 'A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN)' , *Vaccine*. Elsevier, 19(9–10), pp. 1082–1092. doi: 10.1016/S0264-410X(00)00339-X.

Skeiky, Y. A. . *et al.* (2002) 'Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL® adjuvant' , *Vaccine*. Elsevier, 20(27–28), pp. 3292–3303. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00302-X.

Skeiky, Y. A. W. *et al.* (1998) 'LeIF: A Recombinant *Leishmania* Protein That Induces an IL-12-Mediated Th1 Cytokine Profile' , *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. American Association of Immunologists, 161(11), pp. 6171–6179. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058797> (Accessed: 22 March 2018).

Solana, J. C. *et al.* (2017) 'Vaccination with a *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant confers long-term protective immunity against *Leishmania major* infection in two mice models' , *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Edited by C. A. Petersen. Public Library of Science, 11(5), p. e0005644. doi: 10.1371/journal.pntd.0005644.

Soto, M. *et al.* (1998) 'Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis.' , *Journal of clinical microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 36(1), pp. 58–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9431920> (Accessed: 20 March 2018).

de Souza Testasica, M. C. *et al.* (2014) 'Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population' , *Veterinary Parasitology*. Elsevier, 204(3–4), pp. 169–176. doi: 10.1016/J.VETPAR.2014.04.025.

Srivastava, S. *et al.* (2016) 'Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis' , *Parasites & Vectors*. BioMed Central, 9(1), p. 277. doi: 10.1186/s13071-016-1553-y.

Tabatabaie, F. *et al.* (2018) 'Induction of Immune Responses by DNA Vaccines Formulated with Dendrimer and Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA) Nano- Adjuvants in BALB / c Mice Infected with *Leishmania major*' , *Open Access Macedonian Journal of Medical SciencesMacedonian Journal of Medical Sciences*, 6(2), pp. 229–236. doi: 10.3889/oamjms.2018.061.

Tavares, N. M. *et al.* (2011) '*Lutzomyia longipalpis* saliva or salivary protein LJM19 protects against *Leishmania braziliensis* and the saliva of its vector, *Lutzomyia intermedia*.' , *PLoS neglected tropical diseases*. Public Library of Science, 5(5), p. e1169. doi: 10.1371/journal.pntd.0001169.

Thomaz-Soccol, V. *et al.* (2017) 'Recent Advances in Vaccines Against *Leishmania* Based on Patent Applications' , *Recent Patents on Biotechnology*, 12(1), pp. 21–32. doi: 10.2174/1872208311666170510121126.

Torres-Guerrero, E. *et al.* (2017) 'Leishmaniasis: a review' , *F1000Research*, 6, p. 750. doi: 10.12688/f1000research.11120.1.

- Valenzuela, J. G. *et al.* (2001) 'Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein.', *The Journal of experimental medicine*, 194(3), pp. 331–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489952> (Accessed: 11 April 2018).
- Vélez, I. D. *et al.* (2005) 'Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Oxford University Press, 99(8), pp. 593–598. doi: 10.1016/j.trstmh.2005.04.002.
- Vélez, I. D. *et al.* (2009) 'Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis', *Vaccine*. Elsevier, 28(2), pp. 329–337. doi: 10.1016/J.VACCINE.2009.10.045.
- Webb, J. R. *et al.* (1998) 'Human and murine immune responses to a novel *Leishmania* major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 66(7), pp. 3279–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632596> (Accessed: 21 March 2018).
- Wheat, W. H. *et al.* (2017) 'Immunization against full-length protein and peptides from the *Lutzomyia longipalpis* sand fly salivary component maxadilan protects against *Leishmania* major infection in a murine model', *Vaccine*. Elsevier, 35(48), pp. 6611–6619. doi: 10.1016/J.VACCINE.2017.10.039.
- WHO (2004) 'Annex 1 Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations', *World Health Organization WHO Technical Report*, (924), pp. 35–101. Available at: http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/clinical_evaluation/035-101.pdf?ua=1 (Accessed: 3 May 2018).
- World Health Organization (2010) 'Control of the leishmaniasis.', *World Health Organization technical report series*, (949), pp. 22–26. doi: 10.1038/nrmicro1766.
- Xu, X. *et al.* (2011) 'Structure and function of a yellow protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania* major infection.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(37), pp. 32383–93. doi: 10.1074/jbc.M111.268904.
- Zahedifard, F. *et al.* (2014) 'Enhanced protective efficacy of nonpathogenic recombinant *leishmania tarentolae* expressing cysteine proteinases combined with a sand fly salivary antigen.', *PLoS neglected tropical diseases*. Public Library of Science, 8(3), p. e2751. doi: 10.1371/journal.pntd.0002751.
- Zanin, F. H. C. *et al.* (2007) 'Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson, 9(9), pp. 1070–1077. doi: 10.1016/J.MICINF.2007.05.012.

7.2 Sekundární citace

- Gafurov, I. M. (1999) 'Experience in controlling and preventing zoonotic cutaneous leishmaniasis in Uzbekistan', *Meditinskaja parazitologija i parazitarnye bolezni*, (1), pp. 58–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10414052> (Accessed: 21 April 2018).

7.3 Internetové zdroje

- Conselho Regional de Medicina Veterinária da Paraíba (2014) 'Ministério da Agricultura suspende vacina contra a Leishmaniose Visceral Canina', <http://crmvpb.org.br/ministerio-da-agricultura-suspende-vacina-contra-a-leishmaniose-visceral-canina/> (accessed March 17, 2018).

- WHO, World Health Organization (2018) 'Leishmaniasis', <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed May 02, 2018).