

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(10) Número de publicación internacional
WO 2017/190260 A1

(43) Fecha de publicación internacional
09 de noviembre de 2017 (09.11.2017) **W I P O I P C T**

(51) Clasificación internacional de patentes:

A61K 39/005 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
C07K 14/44 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/CL20 17/050020

(22) Fecha de presentación internacional:

02 de mayo de 2017 (02.05.2017)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P20160101264

04 de mayo de 2016 (04.05.2016) AR

(71) Solicitante (para CL solamente): **FERNANDEZ, Maite**

[CL/CL]; Av. Providencia, 1208, Oficina 308, Providencia,
Santiago, Chile, Santiago (CL).

(72) Inventor; y

(71) Solicitante: **BAEREMAECKER, Carlos** [UY/UY]; Ram-
bla República de Perú N° 1483, Montevideo, Uruguay,
Montevideo (UY).

(74) Mandatario: **FERNANDEZ, Fernando**; Alejandro Fle-
ming 8068, Las Condes, Santiago, Chile, Santiago (CL).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG,
AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL,

(54) Title: VACCINE AGAINST TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION

(54) Título: UNA VACUNA CONTRA LA INFECCIÓN POR TRYPANOSOMA CRUZI

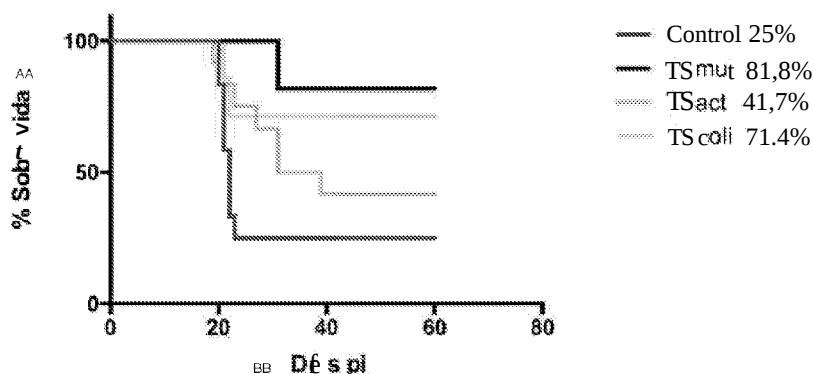


FIGURA 1

AA % Survival
BB Days pi

(57) Abstract: The invention relates to a vaccine composition against Trypanosoma cruzi infection, comprising, at least, a trans-sialidase mutant protein of Trypanosoma cruzi (SEQ 1) and, as an adjuvant, a mixture of a highly purified mineral oil and mannide monooleate.

(57) Resumen: Una composición de vacuna contra la infección por Trypanosoma cruzi que comprende, al menos, una proteína mutante trans-sialidasa de Trypanosoma cruzi (SEQ 1) y, como adyuvante, una mezcla de un aceite mineral altamente purificado y monooleato de manida.

[Continúa en la página siguiente]

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional* (Art. 21(3))

— *con informe de búsqueda internacional* (Art. 21(3))

UNA VACUNA CONTRA LA INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a una vacuna contra la infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), útil en la prevención y/o para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

En particular, la presente invención se refiere a una composición de vacuna que comprende al menos una proteína mutante *trans*-sialidasa de *T. cruzi* y, como adyuvante, una mezcla de un aceite mineral altamente purificado y monooleato de manida. En una realización preferida de la invención, dicho aceite mineral altamente purificado es el comercializado como *Drakeol 6VR*. En otra realización preferida de la invención, el adyuvante es el comercializado como *Montanide*³ *ISA 51 VG* (*Seppic, France*).

En una realización especialmente preferida de la invención, la composición de vacuna comprende una proteína mutante *trans*-sialidasa de *Trypanosoma* posee la secuencia identificada como SEQ 1 y, como adyuvante, *Montanide*⁶ *ISA 51 VG*.

La composición de vacuna de acuerdo con la invención puede ser utilizada contra la parasitemia y, al mismo tiempo, para proteger del daño del tejido causado por los parásitos .

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La enfermedad de Chagas, también conocida como *Tripanosomiasis americana* o "mal de Chagas", es una enfermedad parasitaria transmitida por *Trypanosoma cruzi*, un parásito relacionado con tripanosomas africanos. La forma más común de contraer la enfermedad es a través del contacto con las excretas de triatóminos (*Triatoma infestans* (en nuestra región), conocidos también con los nombres de vinchuca, chinche besucona, benchuca, chipo o barbeiro), el cual se alimenta de la sangre de seres humanos y animales. Una vez que el parásito llega a la herida creada por el insecto, se propaga a través del cuerpo invadiendo las células huésped.

Esta enfermedad es uno de los mayores problemas de salubridad en América Latina, donde aproximadamente entre 8 y 10 millones de personas podrían estar infectadas. Los factores de riesgo para la enfermedad de Chagas incluyen, entre otros, el vivir en México, América Central o del Sur, la pobreza, habitar viviendas precarias donde los insectos hematófagos puedan alojarse en las paredes y las transfusiones sanguíneas de una persona que tenga el parásito, aun cuando el donante no tenga la enfermedad activa. También existe transmisión vertical (madre/hijo) y por alimentos contaminados.

La enfermedad de Chagas presenta dos fases: una aguda y una crónica. La primera se presenta generalmente con síntomas leves, los niños menores de 2 años pueden desarrollar cardiopatías o meningitis (1% de los casos). En el sitio de entrada del parásito se desarrolla inflamación y un

enrojecimiento del sitio de infección. Si la infección se produce a través de la conjuntiva del ojo se genera el Signo de Romaña (patognomónico).

A medida que el parásito se disemina partiendo del sitio de entrada, el paciente presenta fiebre, malestar general, e inflamación generalizada de los ganglios linfáticos. Asimismo, el hígado y el bazo pueden aumentar de tamaño. La enfermedad disminuye su intensidad después de la fase aguda y se vuelve crónica sin manifestar síntomas posteriores durante muchos años. En el 30% de los casos los síntomas finalmente se manifiestan tardíamente, aparecen como enfermedad cardíaca (cardiomiopatía) y digestiva (megavisceras).

Los pacientes pueden presentar insuficiencia cardíaca congestiva, mientras que el primer síntoma de trastorno digestivo puede ser la dificultad para deglutir, lo cual puede llevar a la desnutrición. Los pacientes que presenten infección parasitaria del colon pueden experimentar dolor abdominal y estreñimiento. La enfermedad cardíaca es, por lo general, la causa de la muerte del paciente. Aproximadamente, el 70% de los paciente chagásicos mueren por falla cardíaca debido al daño cardiaco grave.

Dentro de la célula huésped, el parásito se transforma en amastigote que puede multiplicarse muy rápido transformándose nuevamente en tripomastigotes infecciosos. Poco después, las células hospedadoras estallan, dejando libres a los parásitos que podrán infectar otras células.

El mecanismo molecular por el cual el parásito infecta las células del hospedador es muy complejo y ha sido objeto de estudio a lo largo de los últimos años. Se ha demostrado que *T. cruzi* expresa una enzima única en su tipo que transfiere ácido siálico, la cual es capaz de hidrolizar ácidos siálicos con uniones α -2,3 y transferirlos a los residuos de β -galactosa terminales: la enzima *trans*-sialidasa (TS). Una parte de esta enzima fue inicialmente identificada como un antígeno importante (SAPA, Shed Acute Phase Antigen) en la fase aguda de la Enfermedad de Chagas (CITAR Pollevick 1991) para luego caracterizar la actividad enzimática novedosa de la proteína completa (Pollevick GD, Affranchino JL, Frasch AC, Sánchez DO. The complete sequence of a shed acute-phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1991Aug; 47(2):247-50. PubMed PMID: 1840626. Y Parodi AJ, Pollevick GD, Mautner M, Buschiazzi A, Sánchez DO, Frasch AC. Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. EMBO J. 1992 May; 11(5):1705-10. PubMed PMID: 1374711; PubMed Central PMCID: PMC556627).

Esta enzima puede anclarse en la membrana celular del parásito mediante un ancla GPI o, luego de la fragmentación por una enzima lipasa del parásito, puede permanecer en la sangre. La TS desempeña una función importante en el ciclo de infección de *T. cruzi* debido a que permite la invasión de las células del hospedador. Se ha demostrado que cuando se inhibe la actividad TS (por ejemplo utilizando líneas de células mutantes que no tienen ácido siálico sobre su superficie (Ciavaglia M., de Carvalho T.U. y de Souza W. (1993) "Interaction of *Trypanosoma cruzi* with cells with altered glycosylation patterns", Biochem. Biophys. Res. Commun. 193, 718-721; Ming M. y col. (1993) "Mediation of *Trypanosoma* invasión by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on

the trypanosome", Mol. Biochem. Parasitol. 59, 243-252 y Schenkman R.P.S. y col. (1993) "Mammalian cell sialic acid enhances Trypanosoma cruzi invasion", Infect. Immun. 61, 898-902) o bloqueando las moléculas aceptoras en la superficie del parásito (Yoshida N. y col., (1989) "Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50- kilodalton Surface glycoconjugates of Trypanosoma cruzi", Mol. Biochem. Parasitol. 39, 39-46 y Ruiz R. y col. (1993) "The 35/50 kDa surface antigen of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion", Parasitol. Immunol. 15, 121-125) resulta posible inhibir la invasión de las células del hospedador por el parásito. Además, la TS desempeña una función en el mecanismo de defensa del parásito contra el sistema inmunitario del hospedador, ya que es utilizada para cubrir la superficie del parásito con moléculas de ácido siálico, lo cual dificulta que el sistema inmunitario detecte el parásito.

Debido a que la enzima TS cumple una función tan importante en el ciclo de infección y defensa, es que el parásito desarrolló diversos métodos para proteger a la enzima contra el sistema inmunitario del hospedador. Primero, el parásito expresa más de 200 diferentes TS de las cuales sólo aproximadamente 15 son activas (El-sayed N.M. y col., 2005, "The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease", Science 309 (5733), 409- 415). Este hecho dificulta que el sistema inmunitario pueda inhibir la invasión de las células del hospedador por el parásito en el ciclo de infección normal, ya que los parásitos y sus TS se mantienen sólo durante un relativamente corto plazo en el

torrente sanguíneo, para ingresar luego en la célula del hospedador, en donde son protegidos del sistema inmune. Además, las TS tienen una extensión inmunodominante muy larga de repeticiones SAPA, las cuales alejan a los anticuerpos del sitio catalítico de la enzima.

Los medicamentos utilizados tradicionalmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son, el Nifurtimox y el Benznidazol. Estos fármacos sólo funcionan en la fase aguda y crónica temprana de la enfermedad, pero no en la fase crónica. De las dos drogas mencionadas, por lo general, se prefiere tratar la enfermedad de Chagas mediante el Benznidazol, debido a que se ha demostrado que presenta una mejor eficacia y una mejor tolerancia que el Nifurtimox. No obstante, debido a su eficiencia limitada y a sus muchos efectos colaterales, estos medicamentos tienen un uso restringido.

Así, se ha propuesto que la vacunación podría brindar una solución a estos problemas. La vacunación podría ser mucho más eficaz que los medicamentos existentes para tratar a los pacientes crónicos y, además, podría tener un efecto en la prevención de la aparición y progresión de la enfermedad .

Debido a su función primordial en la infección y al hecho de que la enzima se encuentra no sólo expuesta sobre la superficie celular sino que, también, se encuentra presente como molécula libre en la sangre, es que ésta resulta ser un buen blanco para los anticuerpos. Así, la TS puede ser un buen candidato antigénico para la producción de una

vacuna contra la enfermedad de Chagas. Al respecto, teniendo en cuenta que no hay homólogos de la TS en humanos, los anticuerpos que genere el sistema inmune del paciente serían específicos del parásito, por lo que la vacuna no debería presentar efectos colaterales de relevancia .

En la solicitud de patente PCT **WO 2007/107488 A2** se ha reportado que mutantes con actividad enzimática limitada podrían ser utilizados como vacunas. No obstante, dichos mutantes no presentaron una actividad inmunogénica y una eficacia adecuada como para que pudieran ser formulados en una composición de vacuna contra la infección por *Trypanosoma cruzi* adecuada para ser administrada en seres humanos y animales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una vacuna contra la infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), útil en la prevención y/o para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

En particular, la presente invención se refiere a una composición de vacuna que comprende al menos una proteína mutante trans-sialidasa (TS mut) de *T. cruzi* y, como adyuvante, una mezcla de un aceite mineral altamente purificado y monooleato de manida.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. Resultados obtenidos en términos de supervivencia. Se utilizaron tres grupos de 12 ratones macho BALB/cJ de 60 días. Los animales recibieron tres dosis de 15 ug de TS (Grupo A: TS silvestre (WT), Grupo B: TS mut (SEQ 1) y grupo c: control). La primera dosis fue emulsionada en CFA (1:1 vol/vol) y las otras dos en IFA (1:1, vol/vol) y administradas por vía sub-cutánea (s.c.) en intervalos de dos semanas. Control quiere decir solución salina en adyuvante. Los animales fueron infectados con una cepa virulenta de *T. cruzi* DTU TcVI (RA), 500 tripomastigotes sanguíneos por vía intraperitoneal (i.p.). Se hizo un seguimiento de la parasitemia y la mortalidad durante 60 días. Un cuarto grupo de animales (n=7) fue inmunizado con TS obtenida en *E. coli* fTScoli).

FIGURA 2. Valores de parasitemia obtenidos en los ratones de los grupos de la Figura 1. La parasitemia se determinó contando los parásitos en un hemocitómetro (Neubauer). Los valores se expresan como parásitos/ml.

FIGURA 3. Resumen de los resultados (número de equivalentes de parásitos/ng ADN) obtenidos por RT PCR en los tejidos de los siguientes grupos de estudio. **G1**: TS mut (SEQ 1); **G2**: TS WT; **G3**: TS coli; **G4**: Control.

FIGURA 4. Cuantificación de IL2, IL4 y IFN γ por ELISA. (A, C, E) Cada punto representa valores cuadruplicados para cada sobrenadante. (B, D, F) Cada punto representa el promedio de los cuadruplicados. Los cultivos fueron

cosechados 24 horas luego de agregar 5 ug/ml de TSm_{ut} (SEQ 1). Control: Animales inmunizados con PBS/ISA51. TSm_{ut}: Animales inmunizados con TSm_{ut}/ISA51. Mediante re-estimulación *ex vivo* se caracterizó la respuesta específica al antígeno como una clara respuesta Th1, por la significativa producción de IFN γ de animales tratados comparados con animales de control (gráfico 4E y 4F) .

FIGURA 5. Evaluación de anticuerpos específicos anti-TS, inducidos por inmunización con TS mut. Se inmunizaron grupos de 12 ratones BALB/cJ macho inmunizados con TS mut/ISA51. Se administraron tres dosis s.c. según el esquema anteriormente seguido y a los 15 días de la última dosis se ensayó la inducción de IgG1 e IgG2a específicas por ELISA.

FIGURA 6. Resultados obtenidos en términos de parasitemia de ratones inmunizados con TS mut y WT empleando adyuvante de Freund o ISA 51. Los animales fueron desafiados al día 45 de la primera inmunización con una cepa virulenta *T. cruzi* DTU TcVI (RA), 500 tripomastigotes sanguíneos i.p. Se hizo un seguimiento de la parasitemia y la mortalidad durante 60 días. La parasitemia se determinó contando los parásitos en un hemocitómetro (Neubauer) . Los valores se expresan como parásitos/ml .

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inventores de la presente han encontrado que, de manera sorprendente, resulta posible obtener una vacuna contra la

infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que presenta una actividad inmunogénica y una eficacia adecuada para el tratamiento de seres humanos y animales, que comprende al menos una proteína mutante trans-sialidasa (TS mut) de *Trypanosoma cruzi* y, como adyuvante, una mezcla de un aceite mineral altamente purificado y monooleato de manida.

En una realización preferida de la invención, dicho aceite mineral altamente purificado es el comercializado como Drakeol 6VR. En otra realización preferida de la invención, el adyuvante es el comercializado como Montanide® ISA 51 VG (Seppic, France) .

En una realización especialmente preferida de la invención, la composición de vacuna comprende una proteína mutante trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* de la secuencia identificada como SEQ 1 y, como adyuvante, Montanide® ISA 51 VG.

La composición de vacuna de acuerdo con la invención puede ser utilizada contra la parasitemia y, al mismo tiempo, para proteger del daño del tejido causado por los parásitos .

De manera particular, la composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende, de preferencia, una proteína mutante trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* que comprende la siguiente secuencia (SEQ 1) .

Met Leu Ala Pro Gly Ser Ser Arg Val Glu Leu Phe Lys Arg Lys Asn
 1 5 10 15
 Ser Thr Val Pro Phe Glu Asp Lys Ala Gly Lys Val Thr Glu Arg Val
 20 25 30
 Val His Ser Phe Arg Leu Pro Ala Leu Val Asn Val Asp Gly Val Met
 35 40 45
 Val Ala lie Ala Asp Ala Arg Tyr Asp Thr Ser Asn Asp Asn Ser Leu
 50 55 60
 lie Asp Thr Val Ala Lys Tyr Ser Val Asp Asp Gly Glu Thr Trp Glu
 65 70 75 80
 Thr Gln lie Ala lie Lys Asn Ser Arg Val Ser Ser Val Ser Arg Val
 85 90 95
 Val Asp Pro Thr Val lie Val Lys Gly Asn Lys Leu Tyr Val Leu Val
 100 105 110
 Gly Ser Tyr Tyr Ser Ser Arg Ser Tyr Trp Ser Ser His Gly Asp Ala
 115 120 125
 Arg Asp Trp Asp lie Leu Leu Ala Val Gly Glu Val Thr Lys Ser lie
 130 135 140
 Ala Gly Gly Lys lie Thr Ala Ser lie Lys Trp Gly Ser Pro Val Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Lys Phe Phe Pro Ala Glu Met Glu Gly Met His Thr Asn Gln
 165 170 175
 Phe Leu Gly Gly Ala Gly Val Ala lie Val Ala Ser Asn Gly Asn Leu
 180 185 190
 Val Tyr Pro Val Gln Val Thr Asn Lys Arg Lys Gln Val Phe Ser Lys
 195 200 205
 lie Phe Tyr Ser Glu Asp Asp Gly Lys Thr Trp Lys Phe Gly Lys Gly
 210 215 220

Arg 225	Ser	Asp	Phe	Gly	Cys 230	Ser	Glu	Pro	Val	Ala 235	Leu	Glu	Trp	Glu	Gly 240
Lys	Leu	lie	lie	Asn 245	Thr	Arg	Val	Asp	Trp 250	Lys	Arg	Arg	Leu	Val 255	Tyr
Glu	Ser	Ser	Asp	Met 260	Gly	Asn	Thr	Trp 265	Val	Glu	Ala	Val	Gly 270	Thr	Leu
Ser	Arg	Val 275	Trp	Gly	Pro	Ser	Pro 280	Lys	Ser	Asp	His	Pro 285	Gly	Ser	Gln
Ser	Ser 290	Phe	Thr	Ala	Val	Thr 295	lie	Glu	Gly	Met	Arg 300	Val	Met	Leu	Phe
Thr 305	His	Pro	Leu	Asn	Phe 310	Lys	Gly	Arg	Trp	Leu 315	Arg	Asp	Arg	Leu	Asn 320
Leu	Trp	Leu	Thr	Asp 325	Asn	Gln	Arg	lie	Tyr 330	Asn	Val	Gly	Gln	Val 335	Ser
lie	Gly	Asp	Glu 340	Asn	Ser	Ala	Tyr	Ser 345	Ser	Val	Leu	Tyr	Lys 350	Asp	Asp
Lys	Leu	Tyr 355	Cys	Leu	His	Glu	lie 360	Asn	Thr	Asp	Glu	Val 365	Tyr	Ser	Leu
Val	Phe 370	Ala	Arg	Leu	Val	Gly 375	Glu	Leu	Arg	lie	lie 380	Lys	Ser	Val	Leu
Arg 385	Ser	Trp	Lys	Asn	Trp 390	Asp	Ser	His	Leu	Ser 395	Ser	lie	Cys	Thr	Pro 400
Ala	Asp	Pro	Ala	Ala 405	Ser	Ser	Ser	Glu	Ser 410	Gly	Cys	Gly	Pro	Ala 415	Val
Thr	Thr	Val	Gly 420	Leu	Val	Gly	Phe	Leu 425	Ser	Gly	Asn	Ala	Ser 430	Gln	Asn
Val	Trp	Glu 435	Asp	Ala	Tyr	Arg	Cys 440	Val	Asn	Ala	Ser	Thr 445	Ala	Asn	Ala

Glu Arg Val Arg Asn Gly Leu Lys Phe Ala Gly Val Gly Gly Gly Ala
 450 455 460

Leu Trp Pro Val Ser Gln Gln Gly Gln Asn Gln Arg Tyr Arg Phe Ala
 465 470 475 480

Asn His Ala Phe Thr Leu Val Ala Ser Val Thr lie His Glu Ala Pro
 485 490 495

Arg Ala Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ala Ser Leu Asp Ser Ser Gly Gly
 500 505 510

Lys Lys Leu Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Glu Lys His Gln Trp Gln Pro
 515 520 525

lie Tyr Gly Ser Thr Pro Val Thr Pro Thr Gly Ser Trp Glu Thr Gly
 530 535 540

Lys Arg Tyr His Val Val Leu Thr Val Ala Asn Lys lie Gly Ser Val
 545 550 555 560

Tyr lie Asp Gly Glu Leu Leu Glu Gly Ser Gly Gln Thr Val Val Pro
 565 570 575

Asp Gly Arg Thr Pro Asp lie Ser His Phe Tyr Val Gly Gly Tyr Gly
 580 585 590

Arg Ser Asp Met Pro Thr lie Ser His Val Thr Val Asn Asn Val Leu
 595 600 605

Leu Tyr Asn Arg Gln Leu Asn Thr Glu Glu lie Arg Thr Leu Phe Leu
 610 615 620

Ser Gln Asp Leu lie Gly Thr Glu Ala His Met Asp Ser Ser Ser Asp
 625 630 635 640

Thr Ser Ala

EJEMPLOS

Ensayo 1

Todos los estudios fueron realizados de acuerdo a las normas fijadas por CICUAE (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación) de la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM). Los animales fueron confinados en una instalación contenida BSL3 en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas "Dr. Rodolfo A. Ugalde" (IIB), UNSAM, Buenos Aires, Argentina, donde fueron alojados en jaulas individuales, ventiladas por dos semanas antes de comenzar la inmunización. Cada animal fue etiquetado separadamente.

Se utilizaron tres grupos cada uno de 12 ratones macho BALB/cJ de 60 días. Los animales recibieron tres dosis de 15 ug de TS (Grupo A: TS silvestre (WT), Grupo B: TS mut y grupo C: control). La primera dosis fue emulsionada en CFA (1:1 vol: vol) y las otras dos en IFA (1:1, vol:vol) y administradas s.c. en intervalos de dos semanas. Control quiere decir solución salina en adyuvante.

Los animales fueron infectados con una cepa virulenta de *T. cruzi* DTU TcVI (RA), 500 tripomastigotes sanguíneos i.p. Se hizo un seguimiento de la parasitemia y la mortalidad durante 60 días. La parasitemia se determinó contando los parásitos en un hemocitómetro (Neubauer). Los valores se expresan en parásitos/ml.

Grupo A n=12**Días**

1	14	28	42	102
WT/CFA	WT/IFA	WT/IFA	Desafío	Parasitemia/Mortalidad

Grupo B n=11**Días**

1	14	28	42	102
TSmut/ CFA	TSmut/ IFA	TSmut/ IFA	Desafío	Parasitemia/Mortalidad

Grupo C n=12**Días**

1	14	28	42	102
Salina/CFA	Salina/ IFA	Salina/ IFA	Desafío	Parasitemia/Mortalidad

Un cuarto grupo de animales (n=7) fue inmunizado con TS obtenido en *E. coli*.

Los resultados obtenidos en términos de supervivencia y parasitemia se muestran en las Figuras 1 y 2 respectivamente.

Extensión del ensayo 1: TS mut Capacidad Protectora

Los ratones sobrevivientes a este ensayo fueron nuevamente desafiados a los 102 días de haber sido infectados. En esta oportunidad, el desafío se realizó con la misma cepa de parásitos de *T. cruzi*, pero con 10.000 tripomastigotes sanguíneos *i.p.*. Todos los animales sobrevivieron 60 días luego del segundo desafío, y en ese momento fueron

sacrificados. No se observó parasitemia en ninguno de los animales cuando se evaluaron por la prueba de gota fresca.

Ensayos de Histopatología:

En primer lugar se evaluó el nivel de inflamación sobre cortes coloreados con Hematoxilina/Eosina (HE). Para ello, se obtuvo músculo esquelético y corazón de animales infectados con *T. cruzi* y se los fijó en 10% formaldehído en PBS y se los embebió en parafina. Se hicieron cortes de 5 μ m los que fueron teñidos con HE. Seguidamente se realizaron observaciones a simple vista al microscopio óptico sobre los preparados codificados. Se registró la presencia o ausencia de células parasitadas e infiltrados inflamatorios en los tejidos. La inflamación fue evaluada cualitativamente de acuerdo a la presencia o ausencia de necrosis de células musculares y leucocitos polimorfonucleares en los infiltrados (inflamación activa o crónica, respectivamente) y semicuantitativamente en examinación a bajo aumento de acuerdo a la distribución (focal, confluyente o difusa y cantidad de células inflamatorias (1+ por un solo foco inflamatorio, 2+ infiltrados inflamatorios múltiples no confluentes, 3+ inflamación confluyente y 4+ inflamación difusa extendida por todo el corte). Los valores de dos cortes fueron sumadas para obtener un valor inflamatorio promedio.

Posteriormente se evaluó el desarrollo de fibrosis utilizando tinción con Tricrómico de Masson. Para ello se determinó la presencia y el patrón de distribución de fibras colágenas, adjudicándose un valor de 1+ al aumento

del tejido fibroso intersticial que rodea fascículos de fibras musculares y un valor de 2+ a la presencia de tejido fibroso rodeando y aislando fibras musculares individuales atroficas o parches de tejido fibroso denso ocupando un espacio sugestivo de haber correspondido a una fibra muscular desaparecida. Los resultados se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1

Ratón	Corazón					Músculo		
Control		Inflamación	Fibrosis	Total	PCR	Inflamación	Calcio	PCR
123-1					0.043	2	0	3.01
	VI	2	1	3				
	T	2	2	4				
	Promedio	2	1.5	3.5				
123-3					neg	2	2	neg
	VI	2	2	4				
	T	2	2	4				
	Promedio	2	2	4				

Ratón	Corazón					Músculo		
TS mut		Inflamación	Fibrosis	Total	PCR	Inflamación	Calcio	PCR
125-1					neg	3	0	8.86
	VI	2	2	4				
	T	0	0	0				
	Promedio	1	1	2				
125-4					neg	0	1	0.064

	VI	2	2	4				
	T	0	1	1				
	Promedio	1	1.5	2.5				
125-5					neg	2	0	0.53
	VI	1	2	3				
	T	1	2	3				
	Promedio	1	2	3				
126-1					neg	2	0	neg
	VI	2	1	3				
	T	2	2	4				
	Promedio	2	1.5	3.5				
126-2					neg	1	0	neg
	VI	2	2	4				
	T	2	1	3				
	Promedio	2	1.5	3.5				
126-3					neg	0	1	ND
	VI	2	2	4				
	T	1	1	2				
	Promedio	1.5	1.5	3				
126-4					0.035	0	2	ND
	VI	2	2	4				
	T	2	2	4				
	Promedio	2	2	4				
127-11					neg	0	1	ND
	VI	2	1	3				

	T	1	0	1				
	Promedio	1.5	0.5	2				
127-12					neg	1	0	neg
	VI	3	2	5				
	T	2	0	2				
	Promedio	2.5	1	3.5				

Ratón	Corazón					Músculo		
TS E Coli		Inflamación	Fibrosis	Total	PCR	Inflamación	Calcio	PCR
130-3					neg	2	0	neg
	VI	2	1	3				
	T	2	1	3				
	Promedio	2	1	3				
130-6					neg	2	0	ND
	VI	2	1	3				
	T	2	1	2				
	Promedio	2	1	2.5				
131-7					neg	2	0	neg
	VI	2	0	2				
	T	2	2	4				
	Promedio	2	1	3				

Ratón	Corazón					Músculo		
TS WT		Inflamación	Fibrosis	Total	PCR	Inflamación	Calcio	PCR
128-1					0.114	3	0	0.103
	VI	2	2	4				
	T	2	2	4				
	Promedio	2	2	4				
128-2					0.056	3	1	24.03
	VI	2	1	3				
	T	1	1	2				
	Promedio	1.5	1	2.5				
128-4					neg	1	0	neg
	VI	2	0	2				
	T	2	1	3				
	Promedio	2	0.5	2.5				
129-9					neg	0	1	0.063
	VI	2	1	3				
	T	2	1	3				
	Promedio	2	1	3				
127					neg	2	0	2.31
	VI	1	1	1				
	T	1	1	1				
	Promedio	1	1	1				

PCR: equivalentes parasíticos /ng; VI: ventrículo izquierdo; τ: tabique

La evaluación histopatológica del bazo se realizó en base a la distribución, tamaño y morfología de la pulpa blanca y

las características de la población de células en la pulpa roja. Los hallazgos morfológicos en el bazo son indicativos de un estado de activación inmune.

Tabla 2

Raton	Corazon	Músculo esquelítico	Bazo
123-1	Miocarditis crónica inespecífica	Miocarditis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
123-3	Miocarditis crónica inespecífica	Miocarditis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
125-1	Miocarditis crónica inespecífica	Miocarditis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
125-4	Miocarditis crónica activa inespecífica	Cambios histopatológicos del aparato locomotor no significativos	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
125-5	Miocarditis crónica inespecífica	Miocarditis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
126-1	Miocarditis crónica inespecífica	Miocarditis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
126-2	Miocarditis crónica inespecífica	Miocarditis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
126-3	Miocarditis crónica inespecífica	Cambios histopatológicos del aparato locomotor no significativos	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
126-4	Miocarditis crónica inespecífica	Músculo esquelético con calcificaciones multifocales de las fibras musculares	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
127	Miocarditis crónica inespecífica	Miocarditis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
127-11	Miocarditis crónica inespecífica	Cambios histopatológicos del aparato locomotor no	

		significativos	
127-12	Miocarditis crónica inespecífica	Miocarditis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
128-1	Miocarditis crónica inespecífica	Miocarditis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
128-2	Miocarditis crónica inespecífica	Miocarditis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
128-4	Miocarditis crónica inespecífica	Miocarditis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
129-9	Miocarditis crónica inespecífica	Cambios histopatológicos del aparato locomotor no significativos	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
130-3	Miocarditis crónica inespecífica	Miositis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
130-6	Miocarditis crónica inespecífica	Cambios histopatológicos del aparato locomotor no significativos	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
131-7	Miocarditis crónica inespecífica	Miositis crónica activa inespecífica	Hiperplasia folicular linfoide reactiva inespecífica
Control N-1	Tejido miocárdico sin señales de alteraciones histopatológicas	Cambios histopatológicos del aparato locomotor no significativos	Parénquima esplénico sin alteraciones histopatológicas significativas
Control N-2	Tejido miocárdico sin señales de alteraciones histopatológicas	Cambios histopatológicos del aparato locomotor no significativos	Parénquima esplénico sin alteraciones histopatológicas significativas

Carga parasitaria tisular determinada mediante PCR en tiempo real

Se llevó a cabo con aproximadamente 50 mg de tejido (corazón y músculo esquelético). La muestra se conservó en DNAzol (*Invitrogen*) y fue procesada por disgregación mecánica mediante *TissueRuptor*. El ADN precipitado con

isopropanol, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en NaOH y HEPES, de acuerdo con las especificaciones del fabricante .

Cuantificación a través de PCR en tiempo real

Se siguió el protocolo publicado por Cummings y Tarleton en "*Molecular and Biochemical Parasitology*" 129 (2003) 53-59

Breve Descripción:

La detección y cuantificación de los parásitos en la muestra fueron establecidas mediante la amplificación del ADN parasitario, utilizando la región satelital (SAT) del genoma del *T. cruzi* como "*target*" de la reacción. Se utilizaron los oligonucleótidos TCZ-F (GCTCTTGCCACAMGGGTGC) y TCZ-R (CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG) , los cuales amplifican un fragmento de 182pb. Dicha región se encuentra en miles de copias por genoma, lo que aumenta la sensibilidad de detección.

Para la cuantificación del ADN genómico de los ratones, se amplificó un fragmento del gen TNFa (oligonucleótidos TNF-5241 (5-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3) y TNF-5411 (5-CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC-3) . Este es un gen de única copia, lo cual permite su utilización como normalizador del proceso de carga y amplificación durante la reacción.

Se realizaron curvas de calibración para ambas secuencias. La curva TNF se llevó a cabo utilizando mezclas de ADN de las muestras a ser analizadas (y posteriores diluciones en

serie) . Esto permitió la cuantificación en el rango de 200-0.02ng de ADN. La curva SAT se llevó a cabo utilizando ADN de tejido sano (animal no infectado), contaminado con cantidades conocidas de parásitos (y posteriores diluciones en serie) . Esto permitió la cuantificación en el rango de 400-0.04 equivalentes parasitarios. La cuantificación se expresó en equivalentes parásitos/masa ADN. A tal efecto, se normalizó a 10ng y 50ng para el músculo esquelético y corazón, respectivamente.

Los resultados (número de equivalentes de parásitos/ng ADN) obtenidos por RT PCR en los 4 grupos bajo estudio se presentan en la Figura 3 .

Ensayo 2

Determinación del perfil de citoquinas en animales inmunizados con TSmut (SEQ 1)

Se utilizaron ratones macho BALB/cJ de 60 días. Cinco (5) animales recibieron por vía s.c. 15ug de TSmut (SEQ 1) por ratón, diluido en PBS y emulsionado 1:1 con adyuvante ISA51 (Seppic, Francia) (a 100 ul emulsión/ratón) . Otro grupo de cinco (5) animales recibió solamente PBS emulsionado en el mismo adyuvante. Los ratones fueron sacrificados al día +5 post-inmunización . Se realizaron cultivos de esplenocitos (5×10^6 células/ml) en RPMI 1640 complementados con 10% de suero bovino fetal a 37°C y 5% CO₂. Los cultivos fueron estimulados durante 72 horas con el mismo antígeno (5 ug/ml) y los sobrenadantes cosechados 24 horas después. Para cada ratón se realizaron cultivos por cuadruplicado. La concentración de IL2, IL4 y IFN γ en los sobrenadantes

del cultivo fue medida por sandwich ELISA con los pares de anticuerpos monoclonales para la captura y detección de Biolegend (CA, USA) .

En la Figura 4 se observan los resultados de la cuantificación de IL2, IL4 y IFN γ mediante ELISA. (A, C, E) Cada punto representa valores cuádruplicados para cada sobrenadante. (B, D, F) Cada punto representa el promedio de los cuádruplicados. Los cultivos fueron cosechados 24 horas luego de agregar 5 ug/ml de TSmut. Control: Animales inmunizados con PBS/ISA51. TSmut (SEQ 1): Animales inmunizados con TSmut/ISA51.

Mediante re-estimulación *ex vivo* fue posible caracterizar la respuesta específica al antígeno como una clara respuesta Th1 por la significativa producción de IFN γ de animales tratados comparados con animales de control (gráfico 4E y 4F) .

Hay pruebas sólidas que apoyan la importancia de la respuesta Th1 como crucial en la supervivencia a la infección de *T. cruzi* . Sin embargo, cuando se desencadena esta respuesta celular, resulta muy perjudicial para el hospedador, debido al daño que puede producir en el tejido. Actualmente, hay una suma de evidencias que indican que la respuesta protectora real debería agregar fenotipos equilibrados de células Th1/Th2 CD4 T para restringir la diseminación de parásitos, pero evitando daños considerables a los tejidos infectados (Ruiz Diaz, 2015) . (Figura 5)

Ensayo 3

Se llevó a cabo un ensayo para comparar el adyuvante de Freund y Montanide ISA 51VG (Seppic, Francia), un adyuvante aprobado para uso humano y probado en el Ensayo 2. Se evaluó mediante parasitemia y mortalidad.

Los ratones de 60 días recibieron tres dosis de 15 ug de TS-mut (SEQ 1) administradas s.c. con intervalos de dos semanas. El adyuvante de Freund (CFA/IFA) se emulsionó en CFA (1:1 volrvol) en la primera dosis y en IFA (1:1, volrvol) las otras dos. Montanide ISA 51VG se emulsionó 1:1 con el antígeno.

Grupo A n =11

Días

1	15	30	45	105
MUT/CFA	MUT/IFA	MUT/IFA	Desafío	Parasitemia/Mortalidad

Grupo B n =11

Días

1	15	30	45	105
CFA	IFA	IFA	Desafío	Parasitemia/Mortalidad

Grupo C n =10

Días

1	15	30	45	105
MUT/ISA	MUT/ISA	MUT/ISA	Desafío	Parasitemia/Mortalidad

Grupo D n =10

Días

1	15	30	45	105
ISA	ISA	ISA	Desafío	Parasitemia/Mortalidad

Los animales fueron desafiados al día 45 de la primera inmunización con una cepa virulenta *T. cruzi* DTU TcVI (RA), administrando 500 tripomastigotes sanguíneos por vía i.p. Se hizo un seguimiento de la parasitemia y la mortalidad durante 60 días. La parasitemia se determinó contando los parásitos en un hemocitómetro (Neubauer). Los valores se expresan como parásitos/ml.

Los resultados obtenidos en términos de supervivencia y parasitemia se muestran en la Figura 6 y en la Tabla 3 respectivamente :

Tabla 3

Valores de Parasitemia

Grupo	TSmut CFA/IFA	Control CFA/IFA	TSmut ISA	Control ISA
Ratón n°	(X 10 ⁶)	(X 10 ⁶)	(X 10 ⁶)	(X 10 ⁶)
1	0.5	0.2	0.65	4.1
2	0.5	0.2	0.5	4.9
3	0.4	0.3	0.35	3.4
4	1	0.2	0.45	6.9
5	1.5	1.4	0.4	0.5
6	0.35	1.85	0.3	1.1
7	ND	2.9	0.1	0.55
8	0.5	1.25	0.35	2
9	7.5	0.35	0.3	2.15
10	0.3	1.25	0.1	8.5
11	0.4	2.85		

Los valores de parasitemia están expresados como número de parásitos/ml y corresponden a los días 17 pi (R1 a R5) y 20 pi (R6 a R11) .

Los resultados fueron obtenidos utilizando el modelo de ratón macho BALB/c como en Fontanella y col. (2008) . Se utilizaron tres dosis de inmunógeno. En nuestros ensayos, los ratones fueron infectados con la cepa RA del parásito (TcVI) en lugar de la cepa Tulahuen. Las supervivencias con TSmut fueron concordantes en ambos estudios. En nuestros ensayos, el análisis histológico y la carga parasitaria se realizaron luego de redesafiar a los animales con un número más elevado de parásitos, por lo cual no son comparables con los reportados previamente.

Con referencia al artículo de Bontempi y col. (2015), los autores utilizaron ratones hembra BALB/c y redujeron las dosis de antígenos a 10 ug cada uno.

También encontramos una respuesta inmunológica preponderante Th1, que se suscitó inmediatamente después de una dosis única de inmunógeno.

Cuando se realizó un ensayo comparativo entre adyuvantes, el TSmut redujo significativamente la parasitemia vs. el control de adyuvante Montanide ISA 51. El reemplazo de CFA por ISA 51 ofreció una mejor protección global en términos de parasitemia y supervivencia. Se registró una supervivencia del 100% en el grupo TSmut/ISA vs. 63-82% en los ensayos de inmunización TSmut CFA/IFA.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna contra la infección por *Trypanosoma cruzi* **caracterizada** porque comprende, al menos, una proteína mutante trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* y, como adyuvante, una mezcla de un aceite mineral altamente purificado y monooleato de manida.

2. Una composición de vacuna contra la infección por *Trypanosoma cruzi* de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizada** porque dicha proteína mutante trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* es de la secuencia identificada como SEQ 1.

3. Una composición de vacuna contra la infección por *Trypanosoma cruzi* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicho aceite mineral altamente purificado es el comercializado como *Drakeol 6VR*.

4. Una composición de vacuna contra la infección por *Trypanosoma cruzi* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha proteína mutante trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* es de la secuencia identificada como SEQ 1 y porque dicha mezcla de un aceite mineral altamente purificado y monooleato de manida es la comercializada como *Montanide*® ISA 51 VG (*Seppic, France*) .

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQUENCE LISTING

<110> Laboratorio Gador S.A.

<120> UNA VACUNA CONTRA LA INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

<130>

<140>

<141>

<160> SEQ 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 643

<212> PRT

<213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 1

Met	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ser	Arg	Val	Glu	Leu	Phe	Lys	Arg	Lys	Asn
1				5					10					15	

Ser	Thr	Val	Pro	Phe	Glu	Asp	Lys	Ala	Gly	Lys	Val	Thr	Glu	Arg	Val
			20					25					30		

Val	His	Ser	Phe	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu	Val	Asn	Val	Asp	Gly	Val	Met
		35					40					45			

Val	Ala	lie	Ala	Asp	Ala	Arg	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Asp	Asn	Ser	Leu
	50					55					60				

lie	Asp	Thr	Val	Ala	Lys	Tyr	Ser	Val	Asp	Asp	Gly	Glu	Thr	Trp	Glu
65					70				75					80	

Thr	Gln	lie	Ala	lie	Lys	Asn	Ser	Arg	Val	Ser	Ser	Val	Ser	Arg	Val
				85					90					95	

Val	Asp	Pro	Thr	Val	lie	Val	Lys	Gly	Asn	Lys	Leu	Tyr	Val	Leu	Val
			100					105					110		

Gly	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Arg	Ser	Tyr	Trp	Ser	Ser	His	Gly	Asp	Ala
		115					120					125			

Arg Asp Trp Asp lie Leu Leu Ala Val Gly Glu Val Thr Lys Ser lie
 130 135 140
 Ala Gly Gly Lys lie Thr Ala Ser lie Lys Trp Gly Ser Pro Val Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Lys Phe Phe Pro Ala Glu Met Glu Gly Met His Thr Asn Gln
 165 170 175
 Phe Leu Gly Gly Ala Gly Val Ala lie Val Ala Ser Asn Gly Asn Leu
 180 185 190
 Val Tyr Pro Val Gln Val Thr Asn Lys Arg Lys Gln Val Phe Ser Lys
 195 200 205
 lie Phe Tyr Ser Glu Asp Asp Gly Lys Thr Trp Lys Phe Gly Lys Gly
 210 215 220
 Arg Ser Asp Phe Gly Cys Ser Glu Pro Val Ala Leu Glu Trp Glu Gly
 225 230 235 240
 Lys Leu lie lie Asn Thr Arg Val Asp Trp Lys Arg Arg Leu Val Tyr
 245 250 255
 Glu Ser Ser Asp Met Gly Asn Thr Trp Val Glu Ala Val Gly Thr Leu
 260 265 270
 Ser Arg Val Trp Gly Pro Ser Pro Lys Ser Asp His Pro Gly Ser Gln
 275 280 285
 Ser Ser Phe Thr Ala Val Thr lie Glu Gly Met Arg Val Met Leu Phe
 290 295 300
 Thr His Pro Leu Asn Phe Lys Gly Arg Trp Leu Arg Asp Arg Leu Asn
 305 310 315 320
 Leu Trp Leu Thr Asp Asn Gln Arg lie Tyr Asn Val Gly Gln Val Ser
 325 330 335
 lie Gly Asp Glu Asn Ser Ala Tyr Ser Ser Val Leu Tyr Lys Asp Asp
 340 345 350

Lys Leu Tyr Cys Leu His Glu lie Asn Thr Asp Glu Val Tyr Ser Leu
 355 360 365
 Val Phe Ala Arg Leu Val Gly Glu Leu Arg lie lie Lys Ser Val Leu
 370 375 380
 Arg Ser Trp Lys Asn Trp Asp Ser His Leu Ser Ser lie Cys Thr Pro
 385 390 395 400
 Ala Asp Pro Ala Ala Ser Ser Ser Glu Ser Gly Cys Gly Pro Ala Val
 405 410 415
 Thr Thr Val Gly Leu Val Gly Phe Leu Ser Gly Asn Ala Ser Gln Asn
 420 425 430
 Val Trp Glu Asp Ala Tyr Arg Cys Val Asn Ala Ser Thr Ala Asn Ala
 435 440 445
 Glu Arg Val Arg Asn Gly Leu Lys Phe Ala Gly Val Gly Gly Gly Ala
 450 455 460
 Leu Trp Pro Val Ser Gln Gln Gly Gln Asn Gln Arg Tyr Arg Phe Ala
 465 470 475 480
 Asn His Ala Phe Thr Leu Val Ala Ser Val Thr lie His Glu Ala Pro
 485 490 495
 Arg Ala Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ala Ser Leu Asp Ser Ser Gly Gly
 500 505 510
 Lys Lys Leu Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Glu Lys His Gln Trp Gln Pro
 515 520 525
 lie Tyr Gly Ser Thr Pro Val Thr Pro Thr Gly Ser Trp Glu Thr Gly
 530 535 540
 Lys Arg Tyr His Val Val Leu Thr Val Ala Asn Lys lie Gly Ser Val
 545 550 555 560
 Tyr lie Asp Gly Glu Leu Leu Glu Gly Ser Gly Gln Thr Val Val Pro

33

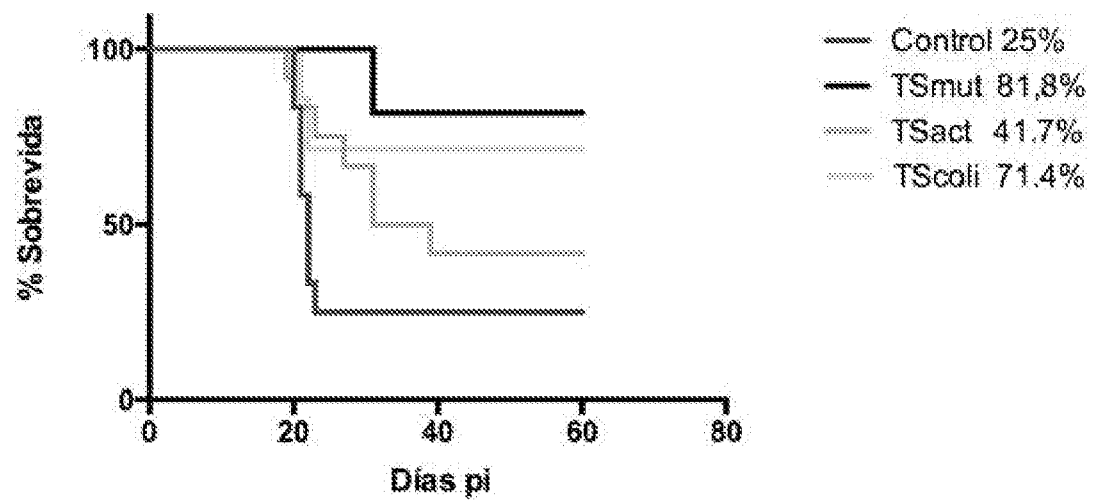


FIGURA 1

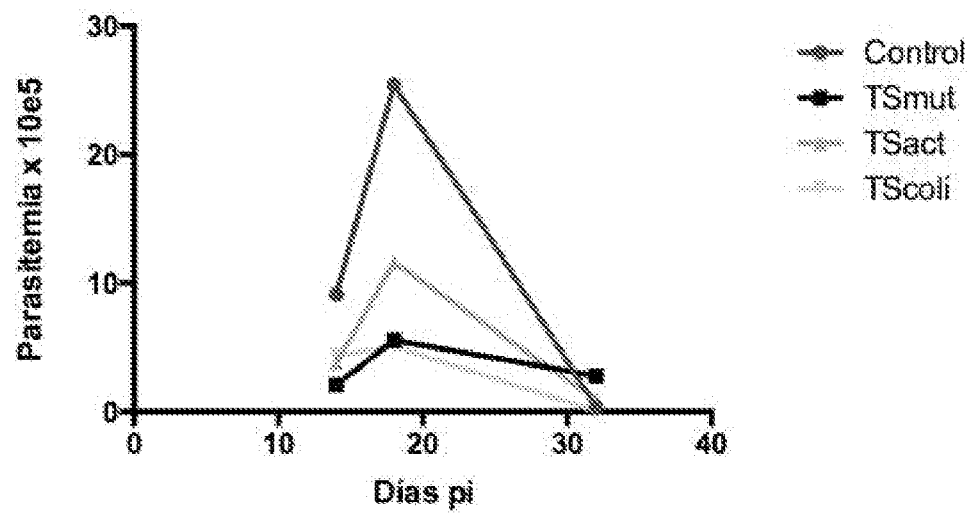


FIGURA 2

G1: TS mut;
G2: TS WT; G3:
TS coli; G4:
Control

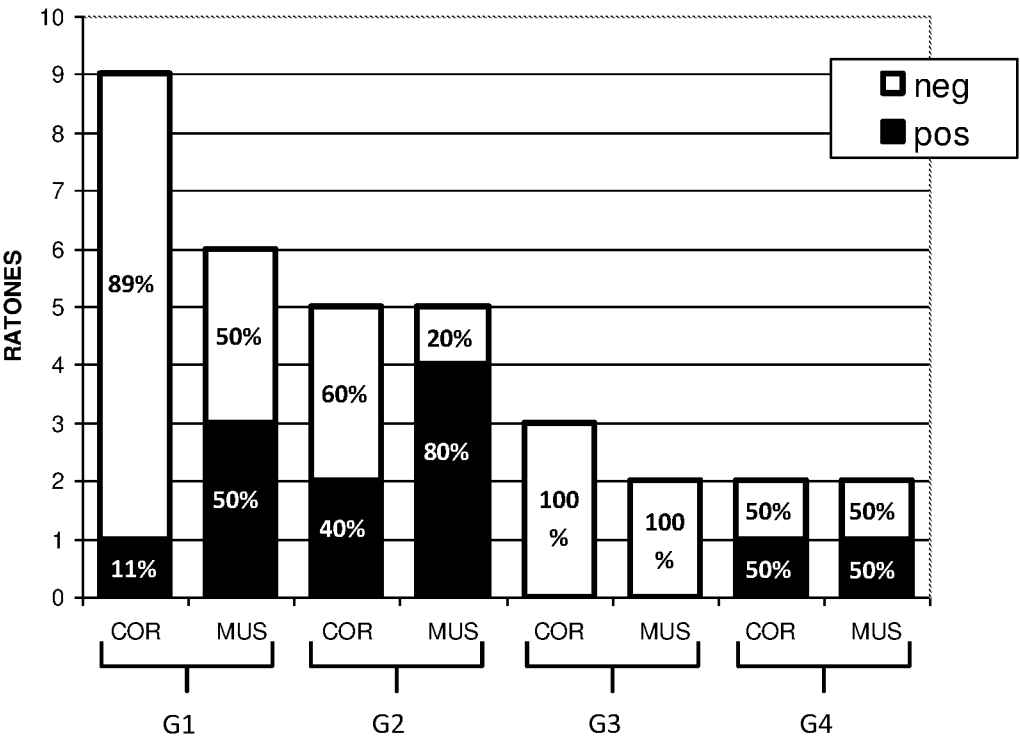


FIGURA 3

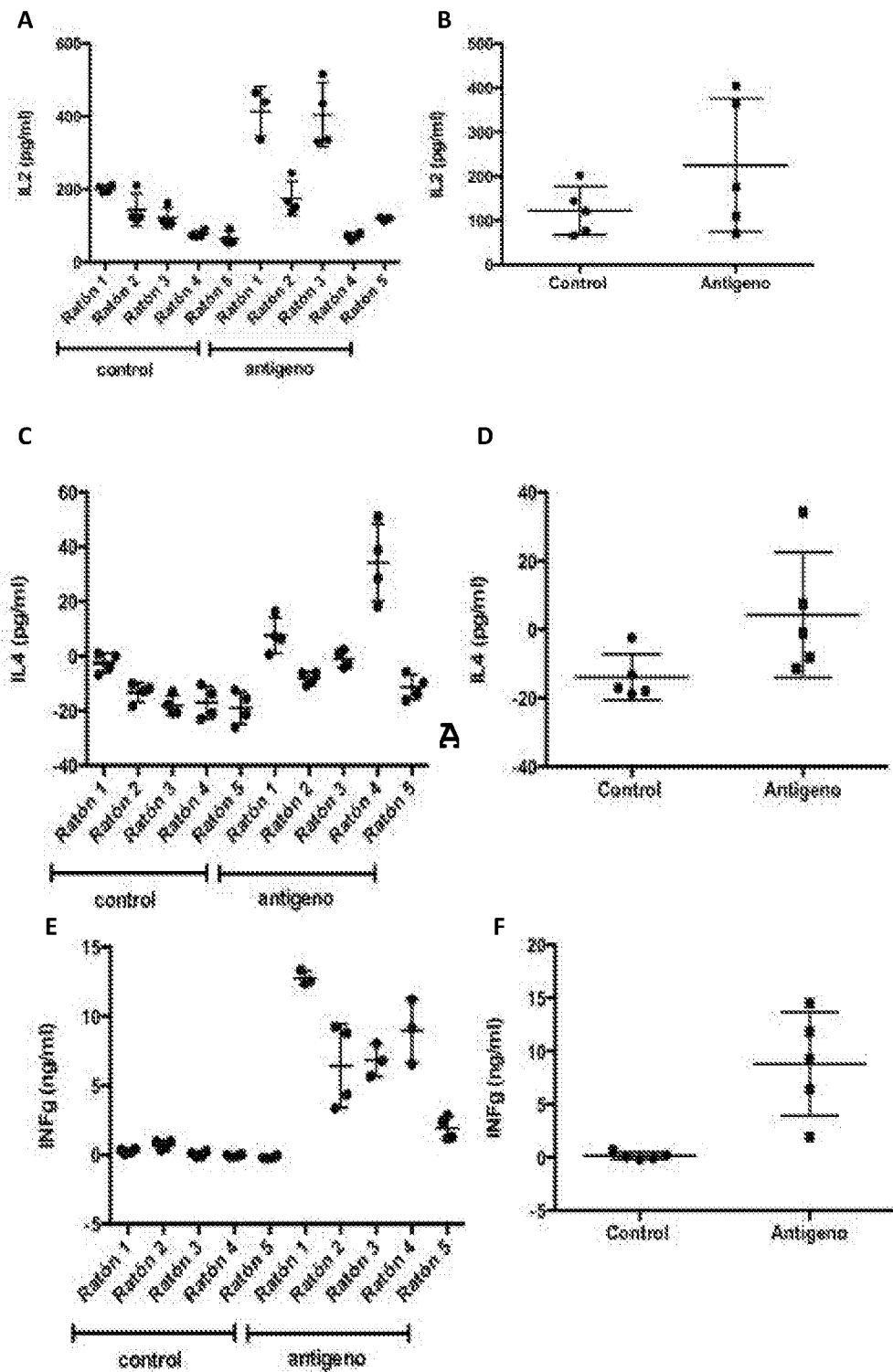


FIGURA 4

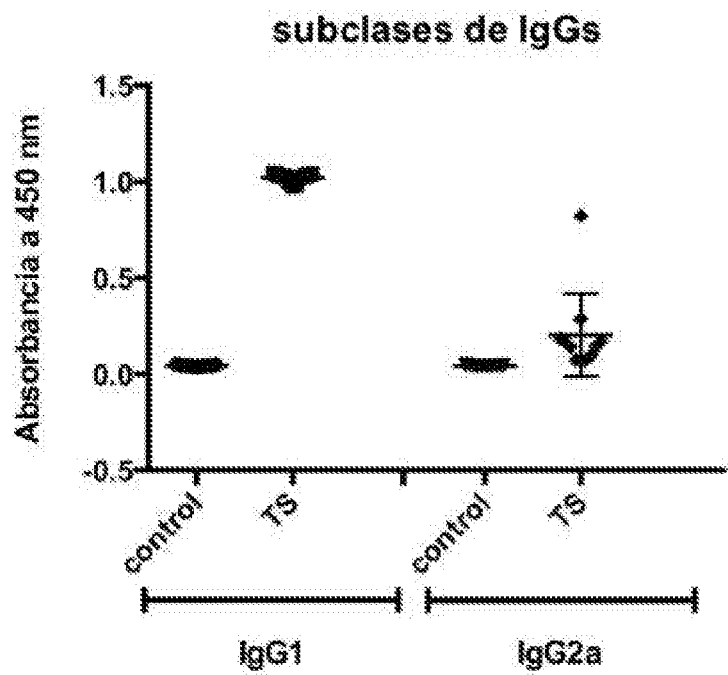


FIGURA 5

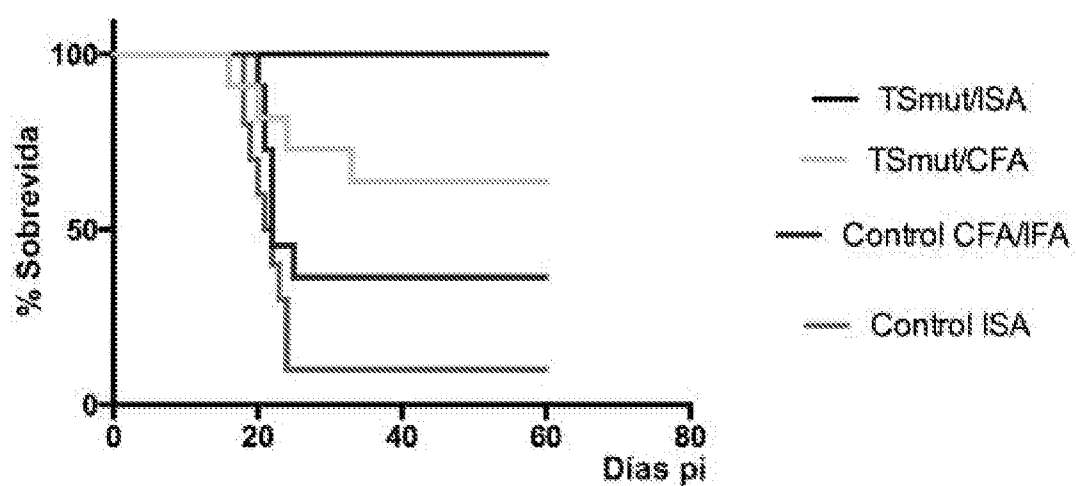


FIGURA 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2017/050020

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(CIP): A61K39/005, C07K14/44, C12N9/24 (2017.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

(CIP): A61K39/005, C07K14/44, C12N9/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practicable, search terms used)

STN, GenomeQuest, Patentscope, Google Scholar

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/1 07488 A2 (VIB VZW) 27 September 2007 The whole document	1-3
L	Freund's Adjuvant, Complete and Incomplete, Catalog Numbers F5881 AND F5506. Product Information Sheet, 2013. SIGMA-ALDRICH. [retrieved on 09-06-2017] retrieved from internet: <www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f5881 > Documento citado para determinar componentes de adyuvantes utilizados en el documento D1.	
A	BONTEMPI, I. A. et al. Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease, Vaccine, 3 March 2015, 33(10): 1274-1283. DOI:10.1016/j.vaccine.2015.01.044. The whole document	
A	FONTANELLA, G. H. et al. Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental Trypanosoma cruzi infection: A vaccine candidate, Vaccine, 2 May 2008, 26(19): 2322-2334. DOI:10.1016/j.vaccine.2008.02.060. The whole document	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document delimiting the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23/06/2017

23 June 2017

Date of mailing of the international search report

31/07/2017

31 July 2017

Name and mailing address of the TSA/

INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile

Authorized officer

GARRIDO GAMBOA, Carolina

Facsimile No.

Telephone No.

56-2-28870551 56-2-28870550

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2017/050020

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STEWART-TULL D. E. Freund's complete and incomplete adjuvants, preparation, and quality control standards for experimental laboratory animals use. En: Methods Mol Biol., Chapter 5. 2010; 626:59-72. doi: 10.1007/978-1-60761-585-9_5. The whole document	
A	Trans-sialidase [Trypanosome cruzi] 15 April 2005 GenBank accession number: CAC34453.1 [retrieved on 08-06-2017] Retrieved from internet: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAC34453.1 > The whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CL20 17/050020

WO 2007/107488 (A2)

27-09-2007

BRPI0709560 (A2)
MX200801 1632 (A)
US201 1038887 (A1)
US9028844 (B2)

19/07/201 1
17/1 0/2008
17/02/201 1
12/05/201 5

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL201 7/050020

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

(CIP): A61K39/005, C07K14/44, C12N9/24 (2017.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

(CIP): A61K39/005, C07K14/44, C12N9/24

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) **gTN, GenomeQuest, Patentscope, Google Scholar**

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	WO 2007/1 07488 A2 (VIB VZW) 27 septiembre 2007 Todo el documento	1-3
L	Freund's Adjuvant, Complete and Incomplete, Catalog Numbers F5881 AND F5506. Product Information Sheet, 201 3. SIGMA-ALDRICH. [Recuperado el 09-06-201 7] Recuperado de internet: <www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f5881 > Documento citado para determinar componentes de adyuvantes utilizados en el documento D1.	
A	BONTEMPI, I. A. et al. Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease, Vaccine, 3 March 201 5, 33(1 0): 1274-1283. DOI:1 0.1 0 16/j.vaccine.201 5.01 .044. Todo el documento	
A	FONTANELLA, G. H. et al. Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental <i>Trypanosoma cruzi</i> infection: A vaccine candidate, Vaccine, 2 May 2008, 26(1 9): 2322-2334. DOI:1 0.1 0 16/j.vaccine.2008.02.060. Todo el documento	

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cila o por una razón especial (como la indicada).	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
23/06/2017 23/junio/2017

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
31/07/2017 31/julio/2017

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile

Funcionario autorizado
GARRIDO GAMBOA, Carolina

N° de fax

N° de teléfono **56-2-28870551 56-2-28870550**

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2017/050020

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	STEWART-TULL D. E. Freund's complete and incomplete adjuvants, preparation, and quality control standards for experimental laboratory animals use. En: Methods Mol Biol., Chapter 5. 2010; 626:59-72. doi: 10.1007/978-1-60761-585-9_5. Todo el documento	
A	Trans-sialidase [Trypanosome cruzi] 15 abril 2005 GenBank accession number: CAC34453.1 [Recuperado el 08-06-2017] Recuperado de internet: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAC34453.1 > Todo el documento	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CL2017/050020

Documento de patente citado en Informe de Búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de Familia	Fecha de Publicación
WO 2007/107488 (A2)	27-09-2007	BRPI0709560 (A2) MX200801 1632 (A) US201 1038887 (A1) US9028844 (B2)	19/07/201 1 17/1 0/2008 17/02/201 1 12/05/201 5