

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
09 de noviembre de 2017 (09.11.2017) WIPO | PCT

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

- (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/CL2017/050020
- (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]; Rambla República de Perú N° 1483, Montevideo, Uruguay, Montevideo (UY).
- (74) Mandatario: FERNANDEZ, Fernando; Alejandro Fleming 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

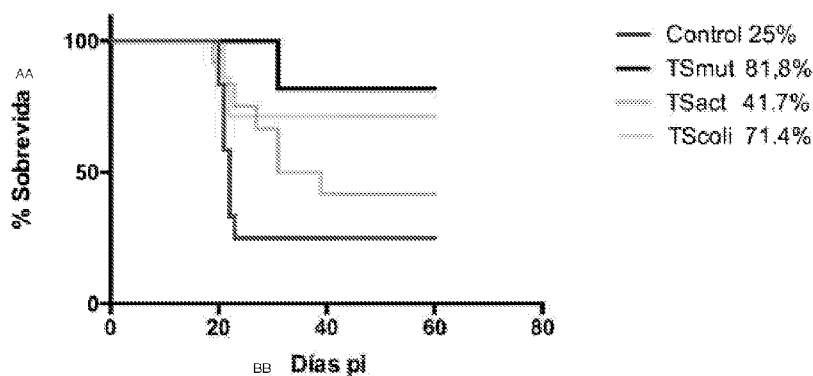


FIGURA 1

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.



WO 2017/190260 A1

ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

— *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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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  $\alpha$ -2,3 y transferirlos a los residuos de  $\beta$ -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, Buschiazzo A, Sanchez 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 invasion 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 invasión", 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 invasión", 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* (TScoli).

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 IFNg 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 TSmut (SEQ 1). Control: Animales inmunizados con PBS/ISA51. TSmut: Animales inmunizados con TSmut/ISA51. Mediante re-estimulación *ex vivo* se caracterizó la respuesta específica al antígeno como una clara respuesta Th1, por la significativa producción de IFN $\gamma$  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 Ile Ala Asp Ala Arg Tyr Asp Thr Ser Asn Asp Asn Ser Leu  
 50 55 60

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

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

Val Asp Pro Thr Val Ile 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 Ile Leu Leu Ala Val Gly Glu Val Thr Lys Ser Ile  
 130 135 140

Ala Gly Gly Lys Ile Thr Ala Ser Ile 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 Ile 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

Ile 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 Ile Ile 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 Ile 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 Ile Tyr Asn Val Gly Gln Val Ser  
 325 330 335

Ile 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 Ile Asn Thr Asp Glu Val Tyr Ser Leu  
 355 360 365

Val Phe Ala Arg Leu Val Gly Glu Leu Arg Ile Ile Lys Ser Val Leu  
 370 375 380

Arg Ser Trp Lys Asn Trp Asp Ser His Leu Ser Ser Ile 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 Ile 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  
 Ile 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 Ile Gly Ser Val  
 545 550 555 560  
 Tyr Ile Asp Gly Glu Leu Leu Glu Gly Ser Gly Gln Thr Val Val Pro  
 565 570 575  
 Asp Gly Arg Thr Pro Asp Ile Ser His Phe Tyr Val Gly Gly Tyr Gly  
 580 585 590  
 Arg Ser Asp Met Pro Thr Ile Ser His Val Thr Val Asn Asn Val Leu  
 595 600 605  
 Leu Tyr Asn Arg Gln Leu Asn Thr Glu Glu Ile Arg Thr Leu Phe Leu  
 610 615 620  
 Ser Gln Asp Leu Ile 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  $\mu$ m los que fueron teñidos con HE. Seguidamente se realizaron observaciones a simple ciego 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			
		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			
		Inflamación	Fibrosis	Total	PCR	Inflamación	Calcio	PCR
TS mut								
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			
		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; T: 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 TNF $\alpha$  (oligonucleótidos TNF-5241 (5-TCCCTTCATCAGTTCTATGGCCCA-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 ( $5 \times 10^6$  células/ml) en RPMI 1640 complementados con 10% de suero bovino fetal a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. 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 $\gamma$  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 $\gamma$  mediante 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 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 $\gamma$  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 vol:vol) en la primera dosis y en IFA (1:1, vol:vol) 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 <sup>6</sup> )	(x 10 <sup>6</sup> )	(x 10 <sup>6</sup> )	(x 10 <sup>6</sup> )
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 redesarfiar 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*<sup>®</sup> 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 version 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 Ile Ala Asp Ala Arg Tyr Asp Thr Ser Asn Asp Asn Ser Leu  
50 55 60

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

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

Val Asp Pro Thr Val Ile 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 Ile Leu Leu Ala Val Gly Glu Val Thr Lys Ser Ile  
 130 135 140

Ala Gly Gly Lys Ile Thr Ala Ser Ile 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 Ile 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

Ile 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 Ile Ile 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 Ile 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 Ile Tyr Asn Val Gly Gln Val Ser  
 325 330 335

Ile 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 Ile Asn Thr Asp Glu Val Tyr Ser Leu  
 355 360 365

Val Phe Ala Arg Leu Val Gly Glu Leu Arg Ile Ile Lys Ser Val Leu  
 370 375 380

Arg Ser Trp Lys Asn Trp Asp Ser His Leu Ser Ser Ile 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 Ile 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

Ile 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 Ile Gly Ser Val  
 545 550 555 560

Tyr Ile Asp Gly Glu Leu Leu Glu Gly Ser Gly Gln Thr Val Val Pro

565

570

575

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

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

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

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

Thr Ser Ala

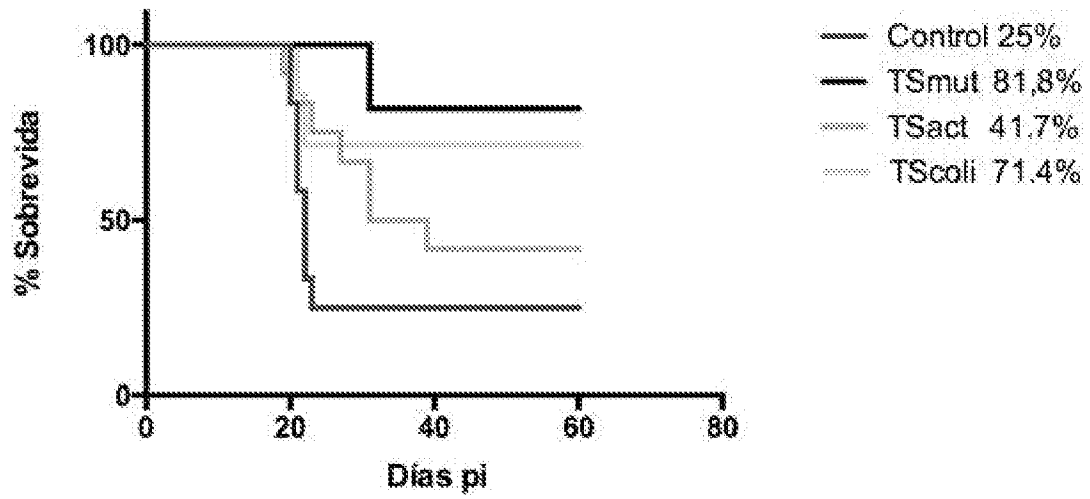


FIGURA 1

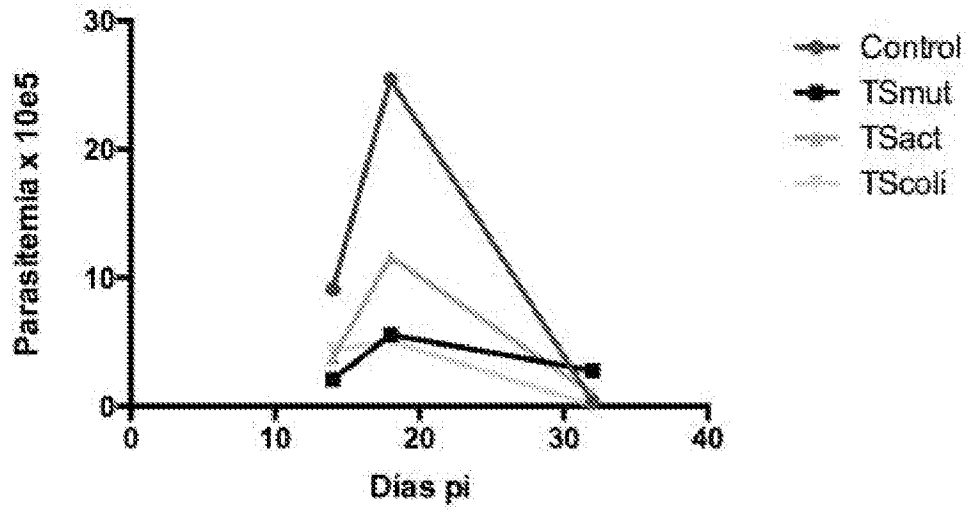


FIGURA 2

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

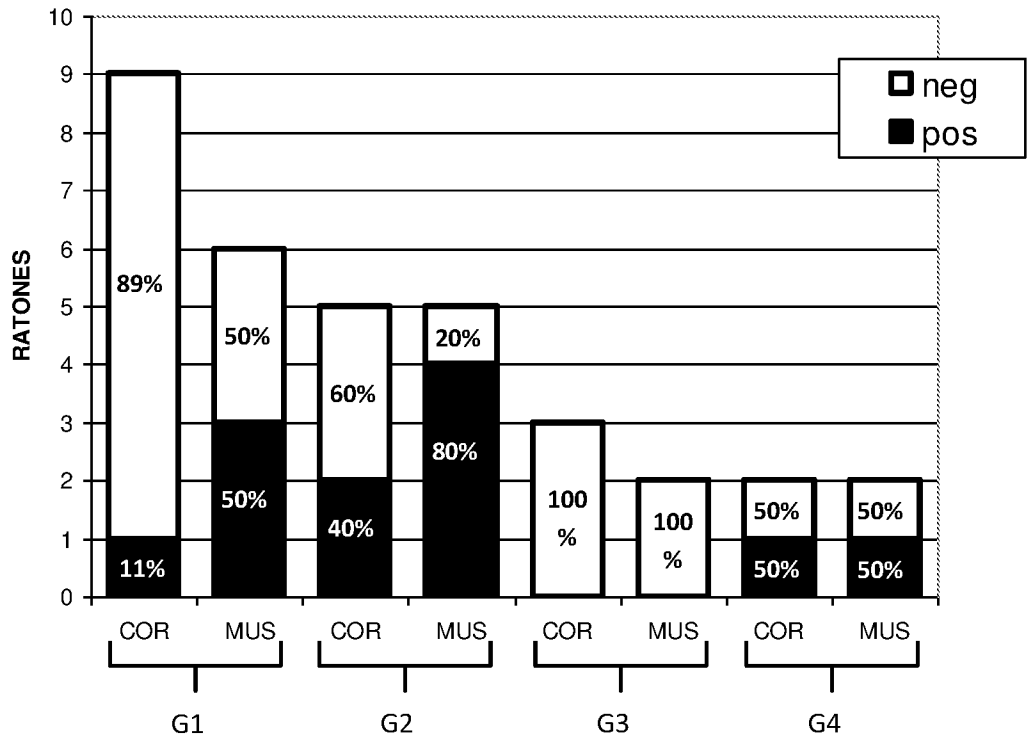


FIGURA 3

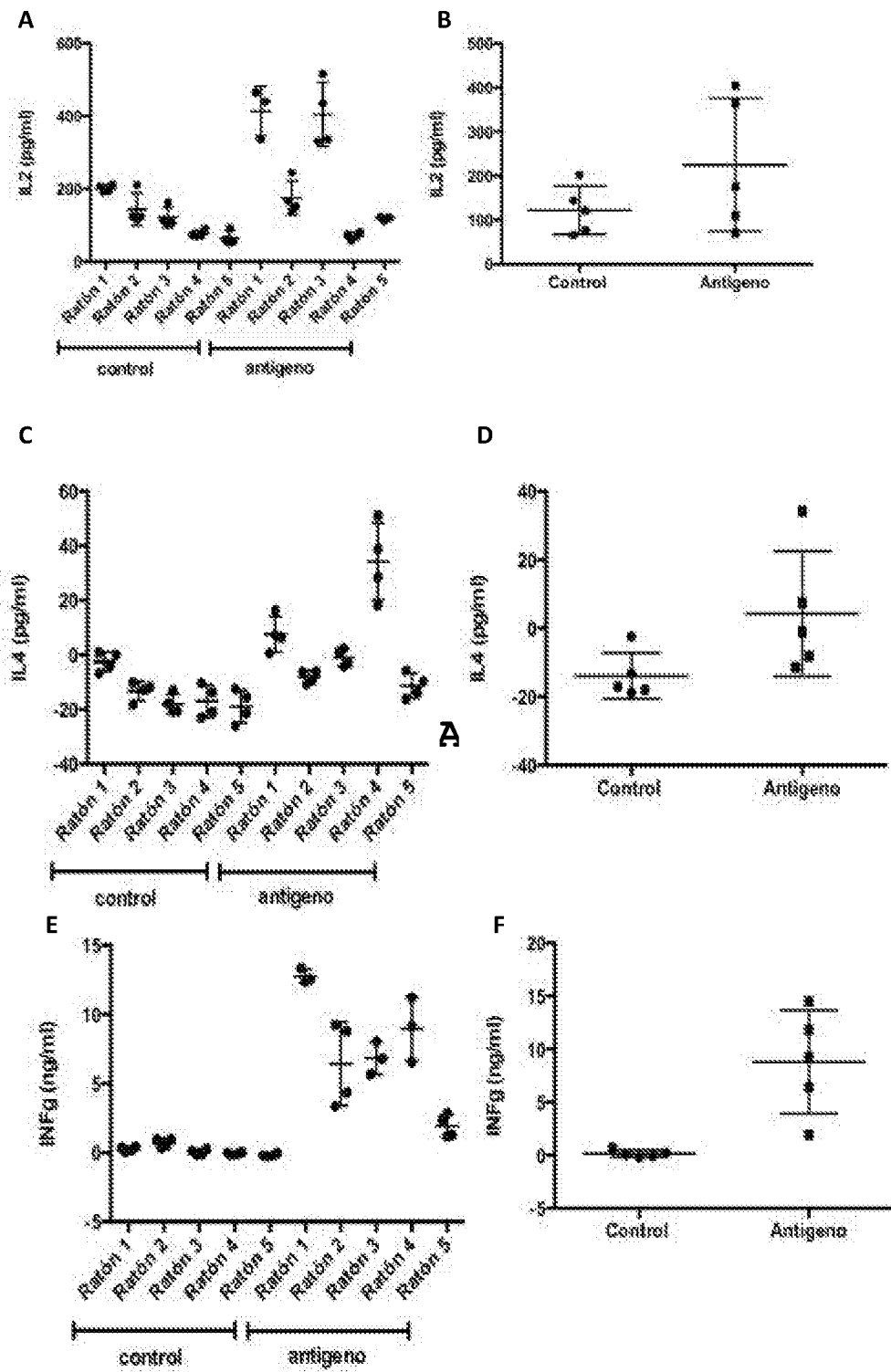
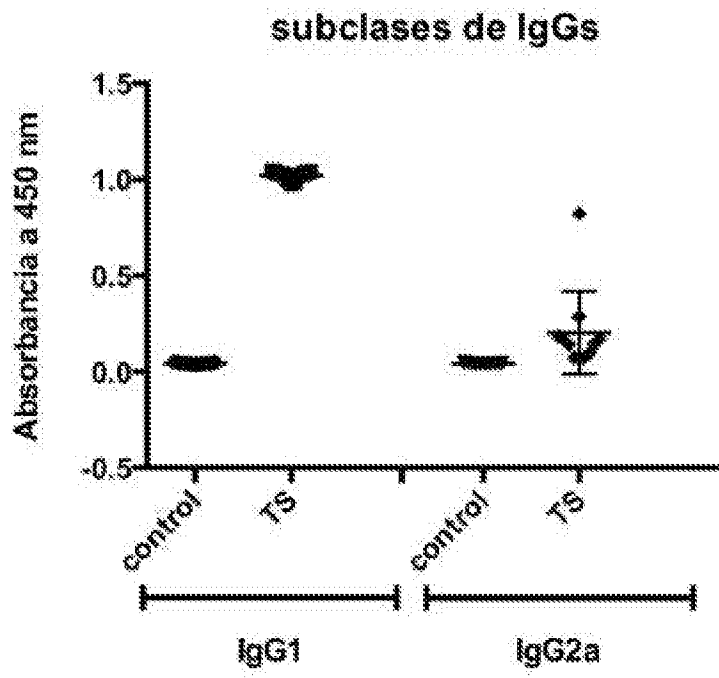


FIGURA 4



**FIGURA 5**

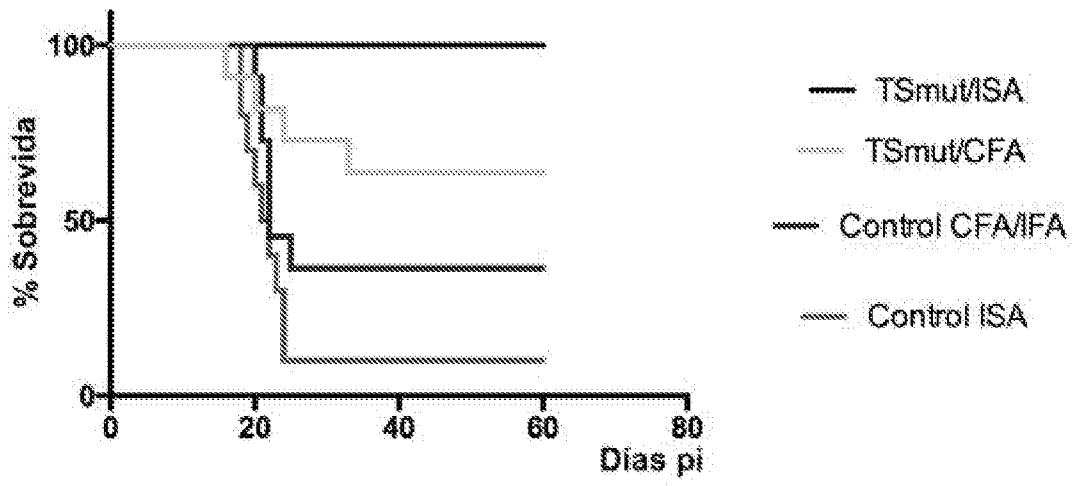


FIGURA 6

## 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 2007/107488 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, <i>Vaccine</i> , 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 <i>Trypanosoma cruzi</i> infection: A vaccine candidate, <i>Vaccine</i> , 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 defining 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

"&amp;" 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 ISA/

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: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAC34453.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAC34453.1</a> > The whole document	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CL2017/050020**

WO 2007/107488 (A2)

27-09-2007

BRPI0709560 (A2)

19/07/2011

MX2008011632 (A)

17/10/2008

US2011038887 (A1)

17/02/2011

US9028844 (B2)

12/05/2015

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°  
PCT/CL2017/050020

## 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) **STN, 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 2007/107488 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, 2013. SIGMA-ALDRICH. [Recuperado el 09-06-2017] 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, <i>Vaccine</i> , 3 March 2015, 33(10): 1274-1283. DOI:10.1016/j.vaccine.2015.01.044. 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, <i>Vaccine</i> , 2 May 2008, 26(19): 2322-2334. DOI:10.1016/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.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"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.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"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 N° de fax	Funcionario autorizado GARRIDO GAMBOA, Carolina 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	<p>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</p>	
A	<p>Trans-sialidase [Trypanosome cruzi] 15 abril 2005                      GenBank accession number: CAC34453.1                      [Recuperado el 08-06-2017]                      Recuperado de internet:                      &lt;<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAC34453.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAC34453.1</a>&gt;                      Todo el documento</p>	

# 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) MX2008011632 (A) US2011038887 (A1) US9028844 (B2)	19/07/2011 17/10/2008 17/02/2011 12/05/2015