

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 943**

51 Int. Cl.:

A61K 39/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2008 E 08844056 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2206513**

54 Título: **Una vacuna multicomponente o monocomponente para usar contra la enfermedad de Chagas**

30 Prioridad:

31.10.2007 AR P070104827

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.05.2016

73 Titular/es:

**DE BAEREMAECKER BARROS, CARLOS
(100.0%)**

**RAMBLA REPÚBLICA DEL PERÚ 1483 PISO 3
MONTEVIDEO, UY**

72 Inventor/es:

DE BAEREMAECKER BARROS, CARLOS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 569 943 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Una vacuna multicomponente o monocomponente para usar contra la enfermedad de Chagas

El objetivo técnico de esta invención es reforzar la respuesta inmunitaria contra antígenos protozoarios y bacterianos, especialmente para aumentar la inducción de la respuesta T citotóxica, esencial contra estos antígenos. Esta invención conducirá al desarrollo de formulaciones vacunales terapéuticas o profilácticas para la enfermedad de Chagas.

Estado de la técnica

Trypanosoma cruzi es un protozoo del orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, que se distingue por la presencia de un único flagelo y una única mitocondria, dentro de la cual, se ordena su genoma en una red compleja y compacta denominada cinetoplasto. Es un parásito intracelular con un ciclo vital que implica a vertebrados e invertebrados.

Existen tres formas diferentes: Amastigoto: Esférica u oval, es la forma reproductiva en el interior de las células de mamífero, Epimastigoto: Alargada, con el cinetoplasto localizado anterior al núcleo, es la forma reproductiva en el tracto digestivo de los invertebrados y en los medios de cultivo, y Tripomastigoto: También alargada, pero con el cinetoplasto localizado posterior al núcleo. Se encuentra en la sangre de los mamíferos y es su forma infectiva. Esta forma no está dividida.

T. cruzi se divide en dos grandes grupos: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. El último se divide en cinco grupos más pequeños: *T. cruzi* IIa, IIb, IIc, II d y IIe.

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es un parásito intracelular protozoario, *Trypanosoma cruzi*. Se transmite mediante un insecto hematófago, *Triatoma infestans*, el cual transmite el parásito cuando el insecto defeca sobre la picadura al alimentarse. En los mamíferos, el ciclo de *T. cruzi* transcurre entre el estadio de tripomastigoto, que circula en la sangre y el estadio de amastigoto, que se replica en el citoplasma de las células infectadas del anfitrión (especialmente en los músculos). La enfermedad de Chagas prevalece en la mayor parte de los países latinoamericanos, incluyendo México y Centroamérica, donde al menos 18 millones de personas están infectadas por *T. cruzi* y al menos 50.000 niños y adultos mueren cada año de enfermedad de Chagas crónica debido a la falta de tratamientos eficaces.

Los triatomas de la familia de los reduvidos, conocido como *vinchuca* (desde Ecuador hasta la Patagonia), *chipo* (en Venezuela), *pito* (en Colombia), y *barbeiro* (en Brasil) son insectos hematófagos, es decir, succionadores de sangre, que viven en grietas, agujeros y zonas de suciedad en las casas o sótanos de las regiones de Sudamérica y Centroamérica. Se infectan al picar a un animal o una persona que ya padece la enfermedad. En general, esta infección se propaga a los seres humanos cuando un insecto infectado deposita heces sobre la piel de una persona mientras la persona duerme por la noche.

La persona suele frotarse la picadura accidentalmente, introduciendo las heces en la picadura, un corte abierto, los ojos o la boca. Los animales también pueden infectarse de la misma forma y también contraen la enfermedad al ingerir el insecto infectado. La persona infectada puede no presentar síntomas de la enfermedad hasta 10 o 15 años después de haberse infectado; esto hace la detección de la enfermedad aún más difícil. Más de 90 millones de personas están en riesgo de infección en las zonas endémicas. Además, en las zonas endémicas, el 2-5 % de los fetos que portan las madres infectadas se abortan o nacen con la enfermedad de Chagas congénita.

La falta de ingresos públicos en función de la pérdida de productividad debida a la enfermedad y a los altos costes médicos tiene un efecto insostenible sobre el crecimiento económico de estos países. El riesgo de transmisión de *T. cruzi* a individuos no infectados a través de trasplantes de órganos y transfusiones de sangre de donantes inmigrantes infectados es muy alto.

Los tratamientos quimioterápicos han tenido un éxito parcial a la hora de controlar la infección por *T. cruzi* y la enfermedad de Chagas. Sin embargo, la alta toxicidad de los fármacos y la escasa eficacia de las terapias disponibles han limitado el uso de la quimioterapia para el tratamiento, tanto de los pacientes crónicos como de los agudos. Además, la terapia farmacológica reduce la gravedad de la enfermedad en los individuos infectados de forma crónica, pero no puede revertir el daño ya causado por los parásitos.

Prácticamente no existen vacunas para la prevención o el tratamiento de la infección por *T. cruzi*. Las vacunas tradicionales constituidas por parásitos inactivados por calor, o fracciones subcelulares de *T. cruzi* proporcionan un grado de protección para las infecciones por *T. cruzi* (M. Basombrio, Exp. Parasitol. 71:1-8 (1990); A. Ruiz y col., Mol. Biochem. Parasitol, 39:117 - 125. (1990)). Sin embargo, estas vacunas fracasan a la hora de obtener el nivel protector de la inmunidad, probablemente debido a la pérdida de epítomos importantes durante la inactivación y/o a la incapacidad de los antígenos para entrar en la vía de procesamiento y presentación antigénica del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, de *Major Histocompatibility Complex*) de clase I, y a la hora de obtener respuestas inmunitarias mediadas por células (J. Monaco. Immunol. Today 13:173 - 179 (1992)). Las vacunas vivas atenuadas son capaces de entrar en la vía del MHC de clase I y podrían obtener respuestas inmunitarias

protectoras. Sin embargo, el peligro de reversión de los parásitos atenuados hacia cepas virulentas si la atenuación no se ha completado hace a estas vacunas impracticables. Se ha demostrado que una vacuna de ADN que contiene el gen que codifica una transialidasa proporciona protección profiláctica frente a las infecciones por *T. cruzi* en ratones (F. Costa y col., *Vaccine* 16:768-774 (1998)), pero no se ha demostrado que evite o revierta la enfermedad, o que estimule una respuesta de linfocitos T CD8+ en animales. Además, se observó respuesta inmunitaria celular y humoral específica en ratones BALB/c inmunizados con una biblioteca de expresión genómica de *T. cruzi* (E. Alberti y col., *Vaccine* 16:608-612 (1998)).

La transialidasa es una enzima de *Trypanosoma cruzi* (el agente que causa la enfermedad de Chagas) necesaria para que este parásito invada las células del anfitrión humano. Dado el hecho de que si el parásito no invade las células, no sobrevivirá en los seres humanos, la transialidasa parece la diana ideal para un ataque inmunológico, es decir, para desarrollar una vacuna. Por lo tanto, el objetivo es una vacuna que, como respuesta cuando se use para inmunizar, pueda producir anticuerpos que inhiban la transialidasa de forma específica.

Existen varias transialidasas producidas en el tripanosoma. Algunas sólo tienen una región necesaria para la actividad enzimática (la transialidación, que es la transferencia de un azúcar denominado ácido siálico). Otras, además de esta región, tienen una segunda región no relacionada con la transialidación, pero que es muy inmunogénica (genera anticuerpos en el anfitrión). Esta segunda región se denomina SAPA (de *Shed-acute-phase-antigen* antígeno segregado de fase aguda) y está formada por unidades repetitivas de aminoácidos.

Los genes (ácidos nucleicos, ADN, formados por unidades denominadas nucleótidos o bases, una región del ADN que codifica una proteína como, en este caso, la transialidasa, se denomina gen) que codifican la región con actividad enzimática y la región SAPA se han identificado.

Una de las moléculas de *T. cruzi* descrita como esencial para la invasión de la célula anfitriona es el ácido siálico (Schenkman S. y col. *Cell* 65, 1117-1126, 1991; Schenkman, S. y col. *Ann. Rev. Microbiol.* 48, 499-523, 1994; Schenkman, S. y Eichinger, D. *Parasitology Today* 9, 218-222, 1993).

Dado que el tripanosoma es incapaz de sintetizar ácido siálico (Schauer, R. y col. *Z. Physiol. Chem.* 364: 1053-1057, 1983), ha de obtenerlo a partir de moléculas que contienen ácido siálico presentes en el entorno. Este proceso se consigue usando enzima exclusiva denominada transialidasa (Pre-viato, J.O. et al., *Mol. Biochem. Parasitol.* 16:8596, 1985 Y Zingales, B., y col., *Mol. Biochem. Parasitol.* 26, 135-144, 1987). La transialidasa es capaz de transferir ácido siálico desde las moléculas sializadas presentes en el entorno, tales como algunas moléculas que se encuentran en la sangre del anfitrión infectado, hasta moléculas presentes en la superficie del tripanosoma.

Las moléculas del tripanosoma que pueden sializarse son las denominadas mucinas (Ruiz, R.C., y col. *Parasite Immunol.* 15,121-12, 1993; M. B. Reyes, y col. *Gene* 140, 139-140, 1994; J. M. Di Noia y col. *J. Biol. Chem.* 270, 24146-24149, 1995; J.M. Di Noia, y col. *J. Biol. Chem.* 271, 32078-32083, 1996). Una vez sializadas, las mucinas son las moléculas que interactúan con la superficie de la célula humana que va a ser invadida, facilitando el proceso de infección (Ruiz, R.C., y col. *Parasite Immunol.* 15, 121-12, 1993). Otros grupos han demostrado que si el parásito no expresa transialidasa, no puede infectar células de la misma forma que lo hacen los parásitos que contienen transialidasa (Pereira y col., *Infect. Immun.* 64, 38843892, 1996). Por lo tanto, la inmunización con transialidasa, efectuada de modo que genere anticuerpos para inhibir la enzima, constituye una útil herramienta para obtener una vacuna contra el parásito. Recientemente se ha demostrado que la respuesta inmunitaria contra la transialidasa es un factor que ayuda a evitar la muerte del anfitrión causada por el parásito ((Chuenkova, M. y Pereira M.E.A., *J. Exp. Med.* 181, 1693-1703, 1995).

Trypanosoma cruzi tiene dos tipos de transialidasas. Un tipo contiene únicamente los aminoácidos necesarios para la actividad de la transialidasa (Briones, M.R.S. y col. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70: 9-17, 1995) y se usó en la solicitud WO 9318787 con el fin de sintetizar carbohidratos, debido a su actividad enzimática, y se propuso en segundo lugar como un inmunógeno en la misma solicitud de patente. Un segundo grupo de transialidasas contiene, además de estas secuencias, una serie de repeticiones de aminoácidos en la región carboxilo terminal, denominada SAPA (C. Ibáñez, y col. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30: 27-34, 1988; J.L. Affranchino, y col. *Mol. Biochem. Parasitol* 34: 221228, 1989; Cazzulo, J.J. y Frasch, A.C.C. *FASEB J.* 6, 3259326, 1992). Esta segunda región es altamente antigénica durante una infección natural en seres humanos (M.B. Reyes, y col., *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 87:2846-2850, 1990).

Las investigaciones más amplias para vacunas se han centrado sobre los intentos de desarrollar vacunas profilácticas de proteínas contra la infección por *T. cruzi*, pero se han llevado a cabo con escaso éxito. El desarrollo de vacunas de subunidades compuestas por antígenos definidos capaces de inducir fuertes respuestas humorales y de linfocitos T de clase 1, y de reducir la carga de parásito, se ha visto obstaculizada debido a la falta de conocimiento de la biología de los tres estadios del desarrollo de *T. cruzi*, la ausencia de información suficiente sobre la secuencia de los genes que se expresan en los estadios contagioso e intracelular, y el punto de vista científico de que la enfermedad crónica no está relacionada con la infección parasitaria persistente, sino que es el resultado de una respuesta autoinmunitaria inducida por el parásito. Buscaglia y col. (*J. Infect. Dis.* 1998;177(2):431-436.) desvelan una vacuna contra la enfermedad de Chagas que comprende una proteína quimérica transialidasa/SAPA (TS-SAPA) y alumin (marca registrada para el aluminato de sodio).

Sumario de la invención

Los objetivos de las presentes invenciones se resuelven como se reivindica en las reivindicaciones.

El primer objetivo de la presente invención es una vacuna contra la enfermedad de Chagas, capaz de estimular la respuesta inmunitaria contra el factor de virulencia transialidasa del parásito *Trypanosoma cruzi*, la vacuna se distingue por el hecho de que comprende una vacuna multicomponente para la enfermedad de Chagas (*tripanosomiasis americana*) que comprende lo siguiente: (a) una porción inmunogénica formada por un polipéptido recombinante o sintético y (b) uno o más polinucleótidos que comprenden regiones que codifican uno o más polipéptidos inmunogénicos, en la que ambos componentes (a) y (b) son de *Trypanosoma cruzi*; en la que la administración de dicha vacuna protege contra la infección por *Trypanosoma cruzi*, la elimina y modera las consecuencias clínicas de dicha infección; en la que la porción inmunogénica es el polipéptido de fusión de transialidasa y SAPA (TS-SAPA) de *Trypanosoma cruzi* codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 5 o que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 6 (tal como se muestra en la figura 5), caracterizado porque la vacuna multicomponente comprende un adyuvante que no destruye la actividad enzimática transialidasa de la porción inmunogénica, en la que el adyuvante es óxido de aluminio.

Otro objetivo de la presente invención es una vacuna monocomponente contra la enfermedad de Chagas que comprende una porción inmunogénica constituida por un polipéptido sintético o recombinante, en la que la porción inmunogénica estimula una respuesta de anticuerpos de linfocitos T CD4+ polarizados hacia Th1 o de linfocitos T CD8+ contra *Trypanosoma cruzi*, en la que la porción inmunogénica es el polipéptido de fusión de transialidasa de y SAPA (TS-SAPA) de *Trypanosoma cruzi* codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 5 o que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 6 (tal como se muestra en la figura 5) caracterizado porque la vacuna monocomponente comprende un adyuvante que no destruye la actividad enzimática transialidasa de la porción inmunogénica, en la que el adyuvante es óxido de aluminio.

Esta invención también incluye las composiciones farmacéuticas que contienen las vacunas multicomponente y monocomponente. Esta invención describe además los procedimientos para la obtención de la porción inmunogénica de dichas vacunas y el ácido nucleico usado en dicho procedimiento.

Descripción de las figuras

Figura 1: Secuencia de los nucleótidos de la región del gen que codifica la proteína de *Trypanosoma cruzi* que tiene actividad transialidasa. Las letras representan cuatro bases (moléculas) que constituyen el ADN (ácido desoxirribonucleico). A: Adenina, T: Timina, C: Citosina, G: Guanina. Cada tres bases (tripleto de bases) codifica un aminoácido (unidad molecular que forma la proteína) que en este caso es transialidasa. El ATG indicado en minúsculas es el primer aminoácido de la transialidasa (aminoácido metionina). El último tripleto TGA es el que usa la célula para indicar dónde termina la proteína (tripleto de terminación). Corresponde a la región 1 de la figura 6.

Figura 2: Secuencias de aminoácidos de la región codificada por el gen mostrado en la figura 1 y que corresponde a la parte de la proteína que tiene actividad transialidasa. Cada letra indica un aminoácido de acuerdo con el código aceptado de forma universal. Corresponde a la región 1 de la figura.

Figura 3: Secuencia de bases que codifica la región de unidades repetitivas de aminoácidos denominada SAPA. Resto de instrucciones similares a las de la figura 1. Corresponde a la región 2 de la figura 6.

Figura 4: Secuencia de aminoácidos codificada de acuerdo con la secuencia de bases indicada en la figura 3 y que corresponde a la proteína SAPA. Corresponde a la región 2 de la figura 6.

Figura 5: Secuencias de nucleótidos (línea superior) (SEQ ID NO. 5) y de aminoácidos (línea inferior) (SEQ ID NO. 6) correspondientes al gen y la proteína respectivamente, resultantes de la unión de transialidasa y SAPA.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una vacuna eficaz para tratar o evitar la infección de un mamífero por derivados de *Trypanosoma cruzi* (es decir, *T. cruzi* y/o una región conservada común a muchos de ellos). En una realización preferida, la vacuna es eficaz contra la infección y/o la enfermedad causada por *T. cruzi*. La vacuna multicomponente de esta invención es para la enfermedad de Chagas (*tripanosomiasis americana*) que comprende lo siguiente: (a) una porción inmunogénica formada por un polipéptido recombinante o sintético y (b) uno o más polinucleótidos que comprenden regiones que codifican uno o más polipéptidos inmunogénicos, en la que ambos componentes (a) y (b) son de *Trypanosoma cruzi*; en la que la administración de dicha vacuna protege contra la infección por *Trypanosoma cruzi*, la elimina y modera las consecuencias clínicas de dicha infección; en la que la porción inmunogénica es el polipéptido de fusión de transialidasa y SAPA (TS-SAPA) de *Trypanosoma cruzi* codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 5 o que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 6 (tal como se muestra en la figura 5), caracterizado porque la vacuna multicomponente comprende un adyuvante que no destruye la actividad enzimática transialidasa de la porción inmunogénica, en la que el adyuvante es óxido de aluminio.

Una vacuna de polinucleótido contiene uno o más polinucleótidos que comprenden las regiones que codifican uno o más polipéptidos inmunogénicos procedentes de *T. cruzi*. De forma similar, una vacuna de polipéptido contiene uno

o más polipéptidos inmunogénicos procedentes de *T. cruzi*.

Otro objetivo de esta invención es una vacuna monocomponente contra la enfermedad de Chagas que comprende una porción inmunogénica constituida por un polipéptido sintético o recombinante, en la que la porción inmunogénica estimula una respuesta de anticuerpos de linfocitos T CD4+ polarizados hacia Th1 o de linfocitos T CD8+ contra *Trypanosoma cruzi*, en la que la porción inmunogénica es el polipéptido de fusión de transialidasa y SAPA (TS-SAPA) de *Trypanosoma cruzi* codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 5 o que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. caracterizado porque la vacuna monocomponente comprende un adyuvante que no destruye la actividad enzimática transialidasa de la porción inmunogénica, en la que el adyuvante es óxido de aluminio.

- 5 *Trypanosoma cruzi*, en la que la porción inmunogénica es el polipéptido de fusión de transialidasa y SAPA (TS-SAPA) de *Trypanosoma cruzi* codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 5 o que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 6 (tal como se muestra en la figura 5), Las vacunas de la invención comprenden un adyuvante que no destruye la actividad enzimática transialidasa de la porción inmunogénica, el cual es óxido de aluminio. La porción comprende 13 unidades repetitivas en la región C-terminal.
- 10 La "porción inmunogénica" de la vacuna es el polipéptido de fusión de transialidasa y SAPA (TS-SAPA) de *Trypanosoma cruzi* codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 5 o que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 6 (tal como se muestra en la figura 5), Las vacunas de la invención comprenden un adyuvante que no destruye la actividad enzimática transialidasa de la porción inmunogénica, el cual es óxido de aluminio. La porción comprende 13 unidades repetitivas en la región C-terminal.
- 15 La porción inmunogénica se obtiene a partir de tripomastigotos de *Trypanosoma cruzi* (es decir, a partir de un *T. cruzi*).

Esta invención se relaciona con una vacuna que es una biomolécula recombinante formada mediante la fusión de esa región que consiste en unidades repetitivas de aminoácidos y el polipéptido con actividad transialidasa.

- 20 La vacuna multicomponente de esta invención estimula preferentemente una respuesta de anticuerpos o una respuesta inmunitaria transmitida a través de células, o ambas respuestas, en el mamífero al cual se administrará la vacuna. La vacuna estimuló preferentemente una respuesta de linfocitos T CD4+ polarizados hacia Th1 o de linfocitos T CD8+. En el caso de una vacuna monocomponente, la vacuna estimula la respuesta de anticuerpos, una respuesta de linfocitos T CD4+ polarizados hacia Th1 o una respuesta de los linfocitos T CD8+. La vacuna puede prepararse incluyendo un polinucleótido que comprenda las regiones que codifican una citocina, para proporcionar la estimulación adicional al sistema inmunitario del mamífero. En un aspecto preferido, la preparación de la vacuna de esta invención incluye un polipéptido inmunogénico que contiene una secuencia de desplazamiento de membrana, para facilitar la introducción del polipéptido en la célula del mamífero y la posterior estimulación de la respuesta inmunitaria transmitida a través de células.
- 25

- 30 Las composiciones farmacéuticas que comprenden la vacuna multicomponente de la presente invención o la vacuna monocomponente de la presente invención junto con un vehículo farmacéutico también son el objeto de esta invención.

- 35 En particular, una composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende una vacuna multicomponente de la presente invención, en la que la porción inmunogénica o el grupo de polinucleótido estimulan una respuesta de anticuerpos de linfocitos T CD4+ polarizados hacia Th1 o de linfocitos T CD8+ contra *Trypanosoma cruzi*, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En particular, una composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende una vacuna monocomponente de la presente invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 40 También se desvela una vacuna de múltiples componentes de polinucleótido. Se prepara insertando dos o más polinucleótidos que comprenden las regiones que codifican uno o más polipéptidos inmunogénicos procedentes de *T. cruzi* en dos o más vectores de polinucleótido, combinando más tarde los vectores de polinucleótido para dar una vacuna de polinucleótido.

- 45 De forma alternativa, esta vacuna relacionada con la invención puede administrarse a un mamífero de forma profiláctica antes de la infección por *T. cruzi*. En una realización preferida, la aplicación de la vacuna ha de ser eficaz para evitar la posterior infección del mamífero por *T. cruzi*. En otra realización, la administración de la vacuna es eficaz para evitar el desarrollo de la enfermedad debilitante crónica en un mamífero tras la posterior infección por *T. cruzi*. En otra realización, la aplicación de la vacuna es eficaz para evitar la muerte del mamífero tras la posterior infección por *T. cruzi*.

- 50 La invención describe un procedimiento para identificar los polipéptidos inmunogénicos de *T. cruzi* de una biblioteca de *T. cruzi*, para usarlos en una vacuna de polinucleótido. El procedimiento utiliza la inmunización con biblioteca de expresión (ELI, de *expression library immunization*) en ratones para identificar los polipéptidos de *T. cruzi* que obtienen una respuesta inmunitaria en un mamífero, eficaz para evitar la muerte, detener o retrasar el avance de la enfermedad en el mamífero que ha sido infectado por *T. cruzi*. El procedimiento puede usarse para identificar los polipéptidos procedentes de *T. cruzi* y de los ratones the BALB/c o B6 que han sido inmunizados.

El procedimiento puede implicar lo siguiente:

- 55 (a) preparación de una micromatriz de ADN que comprenda una fase de lectura abierta de genes de *T. cruzi*;

(b) preparación de una primera sonda que comprenda ADNc de *T. cruzi* procedente de tripomastigoto marcado con Cy3;

(b) preparación de una segunda sonda que comprenda ADNc procedente de amastigoto marcado con Cy5;

5 (d) cohibridación de la primera y segunda sondas a la micromatriz para identificar al menos un gen cuya expresión sea *T. cruzi* durante el estadio de amastigoto intracelular del ciclo infeccioso, en el que el gen codifica un polipéptido inmunogénico candidato de *T. cruzi*; y

(e) inmunización de ratones con el gen para determinar si el gen codifica un polipéptido de *T. cruzi* que obtiene una respuesta inmunitaria en un mamífero, eficaz para evitar la muerte del mamífero, o para detener o retrasar el avance de la enfermedad en el mamífero asociados con la infección del mamífero por *T. cruzi*.

10 Una forma de preparar el inmunógeno usado en las vacunas multicomponente o monocomponente de esta invención comprende las siguientes etapas: a) unión a las secuencias de nucleótido codificadoras del péptido/s inmunogénico/s a un vector capaz de expresar dicha secuencia, b) ligamiento de la secuencia codificadora obtenida en la etapa anterior a un vector capaz de expresar dicha secuencia, c) transformación de un anfitrión capaz de expresar la secuencia codificadora del inmunógeno, d) crecimiento de las bacterias transformadas en la etapa anterior en el medio de cultivo adecuado, e) aislamiento y purificación del inmunógeno obtenido en la etapa anterior. Etapa b) el vector puede ser pET22b+. Los anfitriones son células eucariotas, bacterias, especialmente *Escherichia coli* BL26DE3, y levaduras. El medio de cultivo de la etapa d) puede ser un medio L-Broth.

20 Otra forma de preparar el inmunógeno usado en las vacunas multicomponente o monocomponente de esta invención comprende las siguientes etapas: a) crecimiento de la forma de tripomastigoto de *Trypanosoma cruzi* en un medio de cultivo adecuado, b) obtención del sobrenadante en el que han crecido las formas de tripomastigoto mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, c) filtración del sobrenadante obtenido y paso a través de una columna de afinidad que contenga inmunoglobulinas que reconozcan las repeticiones de la secuencia carboximetilo terminal del inmunógeno, d) elución aumentando el pH para despegar la proteína.

Los péptidos usados en el procedimiento de esta invención pueden obtenerse mediante síntesis química.

25 La invención describe además un ácido nucleico usado en los procedimientos explicados anteriormente porque comprende esencialmente una secuencia codificadora de dicho inmunógeno.

30 Se conocen más de 100 anfitriones naturales mamíferos para los anfitriones de *T. cruzi*, y *T. cruzi* puede transmitirse a un ser humano desde otro anfitrión animal. Puede inmunizarse a cualquier anfitrión mamífero de acuerdo con esta invención. La administración de la vacuna en esta solicitud incluye a seres humanos, animales domésticos tales como perros y gatos, roedores y animales salvajes. Preferentemente, el mamífero que se inmuniza es un perro, un gato o un ser humano.

Vacuna de polinucleótido

35 La vacuna de polinucleótido incluye al menos una, preferentemente al menos dos, regiones de nucleótidos codificadoras, codificando cada región codificadora un componente de polipéptido inmunogénico para *T. cruzi*. Cuando contiene dos o más regiones de nucleótidos codificadoras, la vacuna de polinucleótido se denomina en el presente documento como vacuna multicomponente. Es conveniente reducir al mínimo el número de los diferentes polipéptidos inmunogénicos codificados por las regiones de nucleótidos codificadoras; sin embargo, considerando que una vacuna de polinucleótido genera el mayor nivel de protección, codificará 10 o más polipéptidos inmunogénicos. La vacuna de polinucleótido vacuna contiene ADN, ARN, un ácido nucleico modificado, o cualquier combinación de los mismos. Preferentemente, la vacuna comprende uno o más vectores de expresión o de clonación; más preferentemente, la vacuna comprende una pluralidad de vectores de expresión capaces de la expresión autónoma de una región de nucleótidos codificadora en una célula de mamífero para producir al menos uno o más polipéptidos inmunogénicos o citocinas. Un vector de expresión incluye preferentemente una secuencia de promotor eucariota, más preferentemente, la secuencia de nucleótidos de un promotor eucariota fuerte, ligada de forma operativa a una o más regiones codificadoras. Un promotor es un fragmento de ADN que actúa como una señal reguladora y se una a la ARN polimerasa en una célula para iniciar la transcripción de una secuencia codificadora cadena abajo (en dirección 3'); la transcripción es la formación de una cadena de ARN de acuerdo con la información genética contenida en el ADN. Un promotor está ligado de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico, o puede usarse para controlar o regular la transcripción de esa secuencia de ácido nucleico.

50 Esta divulgación no está limitada a un promotor eucariota específico sino que se hace extensiva a la amplia variedad conocida; preferentemente, el vector de expresión incluye un promotor de CMV o VRS. El promotor usado permanece preferentemente como un promotor constitutivo.

55 Un vector útil en la presente invención puede ser circular o lineal, de cadena simple o de cadena doble y puede ser un plásmido, un cósmido o un episoma pero preferentemente es un plásmido. En una realización preferida, cada región de nucleótidos codificadora (que codifica un polipéptido inmunogénico) está en un vector separado; sin embargo, debe entenderse que pueden estar presentes una o más regiones en un único vector, y estas regiones pueden estar bajo el control de promotores individuales o múltiples. A la vacuna de polinucleótido, Pueden añadirse secuencias de nucleótido codificadoras de citocinas, tales como un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, de *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), interleucina 12 (IL-12) y las moléculas coestimuladoras, tales como B7-1, B7-2, CD40. Las citocinas pueden usarse en varias combinaciones para ajustar la respuesta del sistema inmunitario del animal, incluyendo tanto respuestas de anticuerpos como de linfocitos T

citotóxicos, alcanzando un nivel de respuesta específico necesario para controlar o eliminar la infección por *T. cruzi*. La vacuna de polinucleótido puede incluir un producto de fusión que contenga un polipéptido antigénico y una molécula, tal como CTLA-4, que dirigen el producto de fusión hacia las células con presencia de antígeno dentro del anfitrión.

- 5 Los plásmidos y otros sistemas de dispensación se preparan usando técnicas bien conocidas en biología molecular. Esta invención puede incluir procedimientos para preparar y usar la vacuna de polinucleótido.

Vacuna de polipéptido

10 La vacuna de polipéptido de esta invención incluye un polipéptido inmunogénico de *T. cruzi* (recombinante o sintético), a saber, una porción inmunogénica constituida por un polipéptido recombinante o sintético, en la que la porción inmunogénica es el polipéptido de fusión de transialidasa y SAPA (TS-SAPA) de *Trypanosoma cruzi* codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 5 o que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 6 (tal como se muestra en la figura 5),

15 Como la respuesta de los linfocitos T CD8+ no puede desencadenarse normalmente de forma directa por la administración de una vacuna convencional de subunidades de proteína, los polipéptidos inmunogénicos contenidos en la vacuna de polipéptido pueden incluir una o más secuencias transportadoras de membrana (STM) fusionadas con el N-terminal o el C-terminal o ambos. Una secuencia transportadora de membrana permite el transporte del polipéptido inmunogénico a través de la bicapa de lípidos, permitiendo que se dispense en el interior de una célula de mamífero.

Citocinas

20 Las citocinas son proteínas que regulan la función de las células que las producen o de otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular; inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulina. Las producen fundamentalmente los linfocitos y macrófagos activados, aunque también pueden producirlas los leucocitos polinucleares, las células endoteliales, las células epiteliales y las células del tejido
25 conjuntivo. Dependiendo de la célula que las produzca, se denominan linfocinas (linfocito), monocinas (monocito) o interleucinas (células hematopoyéticas). Su acción principal es la regulación del mecanismo de la inflamación. Hay citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

30 La vacuna de polinucleótido puede incluir al menos una región de nucleótidos codificadora que codifica una citocina. Las citocinas de ejemplo incluyen interleucina 12 (IL-12), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleucina 6 (IL-6), interleucina 18 (IL-18), interferón γ , interferones α , β , y quimiocinas.

Composiciones farmacéuticas

35 Las vacunas de polipéptido de la invención se formulan fácilmente como composiciones farmacéuticas para uso veterinario o humano. La composición farmacéutica incluye opcionalmente excipientes o diluyentes que son farmacéuticamente aceptables, tales como los que fueron compatibles con el material genético. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que es aceptable en el sentido de que es compatible con los diversos componentes de una composición y que no afecta de forma negativa a su comportamiento terapéutico. Son excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del
40 pH, sales, y/o coadyuvantes que mejoren la eficacia de la composición estimuladora de una respuesta inmunitaria. En esta invención también se incluyen algunos procedimientos para preparar y usar esas composiciones farmacéuticas.

Administración de una combinación de una vacuna de polinucleótido y de la vacuna de polipéptido

45 Esta invención desvela la administración de una vacuna de polinucleótido y de una vacuna de polipéptido a un mamífero en un protocolo en serie. Por ejemplo, puede administrarse una vacuna de ADN a base de plásmido al sistema inmunitario primario de un mamífero, seguida de una o más administraciones de una vacuna de polipéptido o de una vacuna vírica (por ejemplo, el vector de la vacuna de polipéptido que porta los genes que codifican los péptidos inmunogénicos y, opcionalmente, las citocinas) para estimular el sistema inmunitario del mamífero. Un experto puede determinar fácilmente el orden de administración de los diversos tipos de vacunas y la naturaleza de
50 las vacunas administradas, en cualquier dosificación (por ejemplo, la vacuna de polipéptido, vacuna de plásmido, vacuna de vector viral) para provocar la respuesta inmunitaria más eficaz en el mamífero.

DEFINICIONES DE CIERTAS PALABRAS Y EXPRESIONES

55 La "enfermedad de Chagas" se refiere a diferentes expresiones clínicas en los pacientes infectados por diferentes variedades de *T. cruzi*, relacionadas al mismo tiempo con el impacto inmunológico crónico sobre diversos tejidos blancos. Por consiguiente, las vacunas conocidas actualmente, bien de monos o bien multicomponentes de

sustancias frecuentemente disponibles de algún tipo de *T. cruzi*, son fórmulas parciales para emprender un tratamiento potencialmente eficaz en cada zona geográfica en la que se desarrolla esta enfermedad, y contra cada forma intra o extracelular del parásito. Además, la inmunogenicidad de dichos componentes frecuentes puede variar a lo largo del tiempo y/o con los cambios en el estado de salud del anfitrión, y por lo tanto, no se garantiza una protección universal continua.

"Linfocito T" se refiere a las células (leucocitos) encargadas de coordinar la respuesta inmunitaria celular, así como de las funciones de cooperación para el desarrollo de cada tipo de respuestas inmunológicas, incluyendo la respuesta de anticuerpos por los linfocitos B. Los linfocitos T pueden diferenciarse de los linfocitos B y de las células citotóxicas debido a la aparición de un receptor especial en la superficie de la membrana, denominado receptor de células T (TCR, de *T-cells Receptor*). T viene de timo, el órgano más importante para la diferenciación de estas células a partir de células madre del sistema linfático.

"Linfocitos T CD4+" se refiere a los linfocitos T responsables de coordinar la respuesta inmunitaria celular, así como de las funciones cooperadoras para el desarrollo de cada tipo de respuesta inmunitaria, incluyendo la respuesta de anticuerpos por los linfocitos B.

"Linfocitos T CD8+" se refiere a los linfocitos T citotóxicos (LTC); Están incluidos en la línea de linfocitos T responsable de la función efectora de la inmunidad celular. Neutralizan las células infectadas por microorganismos intracelulares, atacando directamente a las células infectadas, inyectando enzimas tóxicas y destruyéndolas. Actualmente se denominan CD8+, debido a la presencia del receptor de membrana CD8.

Los LTC son esencialmente capaces de lisar células cuando se estimulan adecuadamente, especialmente por antígenos expresados en el MHC de clase I. Muy específicos en sus funciones letales, tienen la capacidad de destruir una célula diana sin afectar a las células circundantes no infectadas. El proceso de destrucción mediado por células LTC comprende:

- ▶ Reconocimiento antígeno extraño y formación de un conjugado estable con receptores de membrana; MHC-I, TCR, CD8, ICAM-1, LFA-1, entre otros receptores y coestimuladores;
- ▶ Activación de las células CTL por medio de interrelaciones celulares mediadas por proteínas de membrana y transducción de signos intracelulares;
- ▶ Lisis celular que fuerza cambios en la diana de la célula y exocitosis de gránulos tóxicos que contienen principalmente perforina y granzina;
- ▶ Apoptosis de la célula diana que incluye la mediación de moléculas que inducen muerte celular, como Fas y su ligando.

Debido a la alta toxicidad de estos linfocitos, y con el fin de evitar el riesgo innecesario de la circulación continua, las células citotóxicas inactivas o vírgenes requieren dos tipos de señales desencadenantes:

- ▶ Unión del receptor de linfocitos T de la membrana de la célula citotóxica al complejo principal de histocompatibilidad (MHC-I) de tipo I de la superficie de las células que presentan el antígeno (CPA),
- ▶ Las células infectadas por microorganismos, preferentemente los intracelulares (como los virus), muestran restos del microorganismo en su superficie en el contexto de una molécula de MHC-I. La célula infectada muestra antígenos extraños para una CPA que procesa la información para los LTC,
- ▶ Coestimulación a altas concentraciones procedentes de la unión entre la molécula CD40 que aparece en las membranas de las células dendríticas y su ligando (CD40L) de las células citotóxicas. Es una interacción redundante, es decir, cuantos más contactos entre CD40 y su ligando, mayor es la producción de ligandos por el LTC, haciendo a la señal desencadenante más fuerte y más definitiva.
- ▶ En los tejidos infectados, los LTC que reconocen el antígeno implicado se activan y se retienen en la zona de infección, y llevan a cabo su actividad efectora. Los LTC que no reconocen el antígeno implicado vuelven a la circulación.

El "polipéptido inmunogénico" usado en la vacuna contra *T. cruzi* de acuerdo con esta invención se refiere al que puede expresar *T. cruzi* en su estadio extracelular (tripomastigoto), en el estadio extracelular (amastigoto), o durante ambos estadios del ciclo vital. Preferentemente, el *T. cruzi* amastigoto expresa el polipéptido inmunogénico en la etapa precoz de la infección, aproximadamente 24 horas después de la infección inicial.

Un tipo de polipéptidos que ejemplifican los polipéptidos inmunogénicos de acuerdo con la invención son los de la familia de proteínas de la transalidasa, tales como TSA-1 (*T. cruzi* Perú; D. Fouts y col. Mol. Biochem. Parasitol. 46:189 - 200 (1991); GenBank. N° de acceso M58466), ASP-1 (*T. cruzi* el Brasil; M. Santos y col. Mol. Biochem. Parasitol. 86:1-11 (1997); GenBank. N° de acceso H. Lo y col. Mol. Biochem. Parasitol. 88:137 - 149 (1997); GenBank. N° de acceso U77951).

Ventajas de esta invención

Esta invención es la vacuna multicomponente o monocomponente más completa que puede constituir variedades del mismo componente de diferentes *T. cruzi*, especialmente de aquellas porciones conservadas y/o con la adición de dianas diferentes entre ellas, por ejemplo, tomando como diana una o varias transalidasas, proteínas flagelares o

proteasas de cisteína de una o más variedades de *T. cruzi*.

5 El Chagas es una enfermedad que requiere incentivos y protección para las inversiones en desarrollo y distribución; por tanto, no hay espacio para un mercado competitivo de opciones múltiples, como si coexistieran una vacuna argentina, una vacuna brasileña, una vacuna peruana, etc.; en la práctica, las vacunas conocidas en la actualidad no han podido desarrollarse sin dejar desprotegida a una parte importante de la población afectada. Por consiguiente, la invención implica la máxima combinación de inmunogenicidad que afronte la variedad de expresiones clínicas (es decir, una vacuna "continental monodosis").

Se propone una fórmula para usar contra todas las variedades y expresiones clínicas. Hasta la fecha no se han descrito fórmulas con una gama tan amplia de multicomponentes.

10 Ventajas de una vacuna genética

15 La elección de la administración del polinucleótido como una técnica de inmunización ofrece una ventaja excelente sobre los diferentes sistemas que suministran otras vacunas o sistemas de dispensación de antígeno. Las vacunas que contienen material genético se prefieren sobre las vacunas tradicionales porque los vectores son fáciles de construir y producir, el potencial para la modificación de secuencias de mutagénesis dirigidas a mejorar la potencia antigénica de epítomos individuales, o a suprimir epítomos que podrían desencadenar una respuesta indeseable. En el caso de vacunas de ADN, la estabilidad del ADN, la ausencia de los riesgos asociados a las vacunas vivas y atenuadas, su capacidad para inducir inmunidad humoral e inmunidad transmitida por células, y, en concreto, respuestas de linfocitos T CD8+, y la persistencia de las respuestas de la inmunidad.

20 También se ha demostrado su capacidad para mejorar la respuesta inmunitaria mediante la coadministración de genes que codifican citocinas.

TABLA 1: Actividad TS en suero después de la inyección intravenosa de proteína transialidasa (TS) o transialidasa unida a SAPA (TS-SAPA).

Los valores son promedios obtenidos a partir de tres animales independientes por grupo. La determinación se llevó a cabo en muestras de suero recogidas de cada ratón a los 30 minutos, y a las 16, 26 y 110 horas después de la inoculación. La cepa de ratón fue C3H.				
Horas tras la inoculación	0,5	16	26	110
TS*	100 %	3 %	0 %	0 %
TS-SAPA*	100 %	60 %	50 %	5 %
* Valores expresados en % de actividad de la transialidasa restante, considerando como 100% los valores obtenidos 0,5 h después de la inmunización con TS (para los valores de TS) o con TS-SAPA (para los valores de TS-SAPA) respectivamente.				

25 Si en lugar de inyectar una proteína con actividad transialidasa, se inyecta por vía intravenosa a un ratón una proteína que contiene la región con actividad transialidasa unida a la proteína SAPA (TS-SAPA), los resultados obtenidos son diferentes (tabla 1). Cuando las muestras se recogen a diferentes tiempos después de la inyección intravenosa, la actividad transialidasa es detectable hasta 5 días después de la inyección. Estos resultados muestran que a la proteína SAPA, cuando se une a otra proteína como la transialidasa, se le confiere una propiedad nueva: la propiedad de estabilizarse en la sangre, manteniendo esta actividad enzimática en la circulación durante un periodo más largo.

30 Pueden obtenerse resultados similares a los descritos anteriormente cuando se usan otras vías de administración, tales como la intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o cualquier otra que desencadene una respuesta de anticuerpos en el anfitrión inmunizado en lugar de la vía de administración intravenosa. Pueden obtenerse resultados similares igualmente cuando se usan algunos de los adyuvantes inmunizadores ya conocidos, tales como óxido de aluminio u otros que no destruyan la enzima, tal como se detalla a continuación. Un adyuvante es una sustancia, bien oleosa o bien acuosa, o una sustancia con otra estructura, que inyectada conjuntamente con el inmunógeno -en este caso una proteína recombinante como transialidasa/SAPA- contribuye a aumentar la inmunogenicidad, es decir, aumenta la respuesta del sistema inmunitario relacionada con la producción de anticuerpos o la respuesta celular. Una respuesta celular es un tipo de respuesta por parte del sistema inmunitario en la que, básicamente, las células que contribuyen a controlar un agente infeccioso proliferan.

40 Otro resultado obtenido a partir de estos experimentos es que sólo se obtiene una respuesta contra la transialidasa que inhibe su actividad cuando se usa esta enzima como un inmunógeno en su forma activa, es decir, con una conformación que mantenga su actividad enzimática.

TABLA 2: Actividad inhibidora de la transialidasa en suero de animales inmunizados con transialidasa, con repeticiones (TS-SAPA), con adyuvante de Freund (AF), con óxido de aluminio (Al_2O_3), con proteína desnaturalizada por calor a 80 °C (80 °C). La inmunización se llevó a cabo por vía intraperitoneal, en todos los casos con 65 nanogramos para la primera dosis (día 0) y con 13 nanogramos para la segunda dosis en el día 38. La determinación de la inhibición de la transialidasa se llevó a cabo como se describe para los experimentos previos para el día 1 y en el día 45 después de la primera inmunización (día 0). La determinación se expresa en % de la inhibición obtenida en presencia de suero de ratones no inmunizados, cuyos valores de inhibición se consideran como 0. Los valores son el promedio obtenido a partir de cuatro ratones inmunizados independientemente para cada afección.

Días tras la inmunización	1	45
TS-SAPA en AF	0 %	0 %
TS-SAPA en Al_2O_3	0 %	90 %
TS-SAPA a 80 °C	0 %	0 %

Otro resultado obtenido como consecuencia de estos experimentos es que sólo se obtiene una respuesta contra la transialidasa que inhibe su actividad cuando se usa esta enzima como un inmunógeno en su formulación activa, es decir, con una conformación tal que conserve su actividad enzimática. La tabla 2 muestra que cuando el adyuvante usado para inmunizar a los ratones es óxido de aluminio -que no altera la actividad enzimática de la transialidasa- se generan anticuerpos que la inhiben. Sin embargo, si se usa el adyuvante de Freund como adyuvante -el cual destruye la actividad enzimática de la transialidasa, no se generarán en el ratón anticuerpos que inhiban la transialidasa. Del mismo modo, la transialidasa inactivada por calor a 80°C durante 3 minutos de modo que se impide que la proteína mantenga su actividad enzimática, evitando que se estimule mediante la formación de anticuerpos neutralizantes.

Pueden obtenerse resultados similares a los descritos anteriormente cuando se usan otras vías de administración, tales como la intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o cualquier otra que desencadene una respuesta de anticuerpos en el anfitrión inmunizado en lugar de la vía de administración intravenosa.

Además, pueden obtenerse resultados similares cuando alguno de los adyuvantes que se sabe que inmunizan, tales como óxido de aluminio u otros que no destruyan la enzima, tal como se menciona anteriormente, Un adyuvante es oleoso, agua, o una sustancia de otra estructura, que inyectada junto con el inmunógeno, en este caso una proteína recombinante, tal como transialidasa/SAPA, contribuye a aumentar su inmunogenicidad, es decir, aumenta la respuesta del sistema inmunitario con relación a la producción de anticuerpos o a la respuesta celular. La respuesta celular es un tipo de respuesta del sistema inmunitario en la que la proliferación es básicamente de las células que contribuyen a controlar un agente infeccioso.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna multicomponente contra la enfermedad de Chagas que comprende lo siguiente:

- (a) una porción inmunogénica constituida por un polipéptido recombinante o sintético; y
- (b) uno o más polinucleótidos que comprenden las regiones codificadoras de uno o más polipéptidos inmunogénicos;

en la que ambos componentes (a) y (b) son de *Trypanosoma cruzi*;
 en la que la administración de dicha vacuna protege contra la infección por *Trypanosoma cruzi*, la elimina y modera las consecuencias clínicas de dicha infección; en la que la porción inmunogénica es el polipéptido de fusión de transialidasa y SAPA (TS-SAPA) de *Trypanosoma cruzi* codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 5 o que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 6 tal como se muestra en la figura 5;
caracterizada porque la vacuna multicomponente comprende un adyuvante que no destruye la actividad enzimática transialidasa de la porción inmunogénica, en la que el adyuvante es óxido de aluminio.

2. La vacuna multicomponente definida en la reivindicación 1, que estimula al menos una respuesta inmunitaria en el anfitrión seleccionada de entre el grupo que consiste en una respuesta de anticuerpos y/o una respuesta inmunitaria por mediación de células, preferentemente al menos una respuesta de linfocitos T CD4+ polarizados hacia Th1 o de linfocitos T CD8+, lo más preferentemente al menos una respuesta de linfocitos T CD8+.

3. Una vacuna monocomponente contra la enfermedad de Chagas que comprende una porción inmunogénica constituida por un polipéptido sintético o recombinante,
 en la que la porción inmunogénica estimula una respuesta de anticuerpos de linfocitos T CD4+ polarizados hacia Th1 o de linfocitos T CD8+ contra *Trypanosoma cruzi*;
 en la que la porción inmunogénica es el polipéptido de fusión de transialidasa y SAPA (TS-SAPA) de *Trypanosoma cruzi* codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 5 o que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 6 tal como se muestra en la figura 5;
caracterizada porque la vacuna monocomponente comprende un adyuvante que no destruye la actividad enzimática transialidasa de la porción inmunogénica, en la que el adyuvante es óxido de aluminio.

4. Una composición farmacéutica que comprende una vacuna multicomponente definida en la reivindicación 1, en la que la porción inmunogénica o el grupo de polinucleótido estimulan una respuesta de anticuerpos de linfocitos T CD4+ polarizados hacia Th1 o de linfocitos T CD8+ contra *Trypanosoma cruzi*, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5. Una composición farmacéutica que comprende una vacuna multicomponente definida en la reivindicación 3, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

	10	20	30	40	50	60	
10	a	tgCTGGCACC	CGGATCGAGC	CGAGTTGAGC	TGTTTAAAGCG	GCAAAGCTCG	60
61	AAGGTGCCAT	TTGAAAAGGA	CGGCAAAGTC	ACCGAGCGGG	TTGTCCACTC	GTTCCGCCTC	120
121	CCCGCCCTTG	TTAATGTGGA	CGGGGTGATG	GTTGCCATCG	CGGACGCTCG	CTACGAAACA	180
181	TCCAATGACA	ACTCCCTCAT	TGATACGGTG	GCGAAGTACA	GCGTGGACGA	TGGGGAGACG	240
241	TGGGAGACCC	AAATTGCCAT	CAAGAACAGT	CGTGCATCGT	CTGTTTCTCG	TGTGGTGGAT	300
301	CCCACAGTGA	TTGTGAAGGG	CAACAAGCTT	TACGTCTCGG	TTGGAAAGCTA	CAACAGTTCC	360
361	AGGAGCTACT	GGACGTGCA	TGGTGTGCG	AGAGACTGGG	ATATTCTGCT	TGCCGTGGT	420
421	GAGGTACGA	AGTCCACTGC	GGGCGCAAG	ATAACTGCGA	GTATCAAATG	GGGGAGCCCC	480
481	GTGTACTGA	AGGAATTTTT	TCCGCGGAA	ATGGAAGGAA	TGCACACAAA	TCAATTTCTT	540
541	GGCGGTGCAG	GTGTGCCAT	TGTGGCGTCC	AACGGGAATC	TTGTGTACCC	TGTGCAGGTT	600
601	ACGAACAAA	AGAAGCAAGT	TTTTTCCAAG	ATCTTCTACT	CGGAAGACGA	GGGCAAGACG	660
661	TGCAAGTTTG	GGAAGGGTAG	GAGCGCTTTT	GCGTGCCTG	AACCTGTGGC	CCTTGTAGTG	720
721	GAGGGGAAGC	TCATCATAAA	CACTCGAGTT	GACTATCGCC	GCCGTCTGGT	GTACGAGTCC	780
781	AGTGACATGG	GGAATTCGTG	GCTGGAGGCT	GTCGGCACGC	TCTCACGTGT	GTGGGCCCC	840
841	TCACCAAAAT	CGAACCAAGC	CGGCAGTCAG	AGCAGCTTCA	CTGCCGTGAC	CATCGAGGGA	900
901	ATGCGTGTTA	TGCTCTTCAC	ACACCCGCTG	AATTTTAAGG	GAAGGTGGCT	GCCGACCGA	960
961	CTGAACCTCT	GGCTGACGGA	TAACCAGCGC	ATTTATAACG	TGGGCAAGT	ATCCATTGGT	1020
1021	GATGAAAATT	CCGCTACAG	CTCCGTCTG	TACAAGGATG	ATAAGCTGTA	CTGTTTGCAT	1080
1081	GAGATCAACA	GTAACGAGGT	GTACAGCCTT	GTTTTTGCGC	GCCTGGTTGG	CGAGCTACGG	1140
1141	ATCATTAAAT	CAGTCTGCA	GTCCTGGAA	AATTGGGACA	GCCACTGTG	CAGCATTTC	1200
1201	ACCCCTGCTG	ATCCAGCCGC	TTCTGCTCA	GAGCGTGGT	GTGGTCCCG	TGTCAACCAG	1260
1261	GTTGGTCTTG	TTGGCTTTTT	GTCGCACAGT	GCCACCAAAA	CCGAATGGGA	GGATGCGTAC	1320
1321	CGCTGCGTGA	ACGCAAGCAC	GGCAAATGCG	GAGAGGGTTC	CGAACGGTIT	GAAGTTTGGC	1380
1381	GGGGTGGCG	GAGGGCGCT	TTGGCCGCTG	AGCCAGCAGG	GGCAGAATCA	ACGGTATCGC	1440
1441	TTTGCAAAAC	ACGCGTTCAC	CGTGGTGGCG	TGGTGAACGA	TTCACGAGGT	TCCGAGCCTC	1500
1501	GCGAGTCTTT	TGCTGGGTGC	GAGCCTGGAC	TCTTCTGGTG	GCAAAAAACT	CCTGGGCTC	1560
1561	TCGTACGACG	AGAGGCACCA	GTCGCAGCCA	ATATACGGAT	CAACGCCGGT	GACGCCGACC	1620
1621	GGATCGTGGG	AGATGGGTAA	GAGGTACCAC	GTGGTCTCTA	CGATGGCGAA	TAAAATTGGC	1680
1681	TCCGAGTACA	TTGATGGAGA	ACCTCTGGAG	GGTTCAGGGC	AGACCGTTGT	GCCAGACGAG	1740
1741	AGGACGCCCT	ACATCTCCCA	CTTCTACGTT	GCGGGTATA	AAAGGAGTGA	TATGCCAACC	1800
1801	ATAAGCCACG	TGACGGTGA	TAATGTTCTT	CTTACAACC	GTCAGCTGAA	TGCCGAGGAG	1860
1861	ATCAGGACCT	GTTCCTTGAG	CCAGGACCTG	ATTGGCACGG	AAGCACACAT	GGACAGCAGC	1920
1921	AGCGACACGA	GTCCctga					1938
	10	20	30	40	50	60	

FIGURA 1

	10	20	30	40	50	60	
5	LAPGSS	RVELFKRQSS	KVPFERDQKV	TERVVHSFRL	PALVNVGVM	VALADARYET	60
61	SNDNSLIDTV	AKYSVDDGET	WETQLAIKNS	RASSVSRVVD	PTVIVKGNKL	YVLVGSYNSS	120
121	RSYWTSHGDA	RDWDILLAVG	EVTKSTAGGK	ITASIKWQSP	VSLKEFFPAE	MEGMHINQFL	180
181	GGAGVAIVAS	NGNLVYVQV	TNKKQVFSK	IFYSEDEGKT	WKFGKGRSAF	GCSEPVALEW	240
241	EGKLIINIRV	DYRRRLVYES	SEMGNWLEA	VTLSRVWGP	SPKSNQPGSQ	SSFTAIVTIEG	300
301	MRVMLFTHPL	NFKGRWLRDR	LNLWLTDNQR	IYNVQVVSIG	DENSAYSSVL	YKDDKLYCLH	360
361	BINSNEVYSL	VFARLVGELR	IIKSVLQSWK	NWDSHLSIC	TPADPAASSS	ERGCGPAVTT	420
421	VGLVGFLSHS	ATKTEWEDAY	RCVNASTANA	ERVFNGLRFA	GVGGGALWPF	SQQGQNRQYR	480
481	FANHAFTVVA	SVTIHEVPSV	ASPLLQASLD	SSGKLLGL	SYDERHQWQP	IYGSTPVTPT	540
541	GSWEMGKRYH	VVLTMANKIG	SEYIDGEPLE	GSGQTVVPE	RTPDISHFYV	GGYKRSMDPT	600
601	ISHVTVNVVL	LYNRQLNAEE	IRTLFLSQDL	IGTEAHMDSS	SDTSAZ		649
	10	20	30	40	50	60	

FIGURA 2

	10	20	30	40	50	60	
3037				AGTG	CCCACGGTAC	GCCCTCAACT	3060
3061	CCCGTTGACA	GCACTGCCCA	CGGTACGCCC	TCGACTCCCG	CTGACAGCAG	TGCCCACAGT	3120
3121	ACGCCCTCGA	CTCCCGCTGA	CAGCAGTGCC	CACAGTACGC	CCTCGACTCC	CGTTGACAGC	3180
3181	AGTGCCCA	GTACGCCCTC	GACTCCCGCT	GACAGCAGTG	CCCACAGTAC	GCCCTCGACT	3240
3241	CCCGTTGACA	GCACTGCCCA	CAGTACGCCC	TCAACTCCCG	TTGACAGCAC	TGCCACGGT	3300
3301	ACGCCCTCGA	CTCCCGCTGA	CAGCAGTGCC	CACAGTACGC	CCTCAACTCC	CGTTGACAGC	3360
3361	AGTGCCCA	GTACGCCCTC	GACTCCCGCT	GACAGCAGTG	CCCACAGTAC	GCCCTCAACT	3420
3421	CCCGTTGACA	GCACTGCCCA	CAGTACGCCC	TCGACTCCCG	CTGACAGCAG	TGCCACGGT	3480
3481	ACGCCCTCGA	CTCCCGCTGA	CAGCAGTGCC	CACAGTACGC	CCTCAACTCC	CGTTGACAGC	3540
3541	AGTGCCAATG	GTACGGTTTT	GATTTTGCCC	GATGGCGCTG	CACTTTCCAC	CTTTTCGGGC	3600
3601	GGAGGGCTTC	TTCGTGTGTC	GTGTGCTTTG	CTGCTGCACG	TGTTTTTTAC	GCCAGTTTTT	3660
3661	TTCGTGAtgt						3669
	10	20	30	40	50	60	

FIGURA 3

	10	20	30	40	50	60	
1	SAHSTPSTFV	DSTAHTPST	PADSSAHSTP	STPADSSAHS	TPSTPVDSSA	HSTPSTPADS	60
61	SAHSTPSTFA	DSSAHSTPST	PVDSTAHTP	STPADSSAHS	TPSTPVDSSA	HSTPSTPADS	120
121	SAHSTPSTFV	DSSAHSTPST	PADSSAHSTP	STPVDSSAHS	TPSTPADSSA	NGTVLILPDG	180
181	AALSTFSGGG	LLLCACALLL	HVFFTAVFFZ				211
	10	20	30	40	50	60	

FIGURA 4

1/1	31/11
atg CTG GCA CCC GGA TCG AGC CGA GTT GAG	CTG TTT AAG CGG CAA AGC TCG AAG GTG CCA
M L A P G S S R V E	L F K R Q S S K V P
61/21	91/31
TTT GAA AAG GAC GGC AAA GTC ACC GAG CGG	GTT GTC CAC TCG TTC CGC CTC CCC GCC CTT
F E K D G K V T E R V	V V H S F R L P A L
121/41	151/51
GTT AAT GTG GAC GGG GTG ATG GTT GCC ATC	GCG GAC GCT CGC TAC GAA ACA TCC AAT GAC
V N V D G V M V A I A	D A R Y E T S N D
181/61	211/71
AAC TCC CTC ATT GAT ACG GTG GCG AAG TAC	AGC GTG GAC GAT GGG GAG ACG TGG GAG ACC
N S L I D T V A K Y S	V D D G E T W E T
241/81	271/91
CAA ATT GCC ATC AAG AAC AGT CGT GCA TCG	TCT GTT TCT CGT GTG GTG GAT CCC ACA GTG
Q I A I K N S R A S S	S V S R V V D P T V
301/101	331/111
ATT GTG AAG GGC AAC AAG CTT TAC GTC CTG	GTT GGA AGC TAC AAC AGT TCG AGG AGC TAC
I V K G N K L Y V L V	G S Y N S S R S Y
361/121	391/131
TGG ACG TCG CAT GGT GAT GCG AGA GAC TGG	GAT ATT CTG CTT GCC GTT GGT GAG GTC ACG
W T S H G D A R D W D	I L L A V G E V T
421/141	451/151
AAG TCC ACT GCG GGC GGC AAG ATA ACT GCG	AGT ATC AAA TGG GGG AGC CCC GTG TCA CTG
K S T A G G K I T A S	I K W G S P V S L
481/161	511/171
AAG GAA TTT TTT CCG GCG GAA ATG GAA GGA	ATG CAC ACA AAT CAA TTT CTT GGC GGT GCA
K E F F P A E M E G M	H T N Q F L G G A
541/181	571/191
GGT GTT GCC ATT GTG GCG TCC AAC GGG AAT	CTT GTG TAC CCT GTG CAG GTT ACG AAC AAA
G V A I V A S N G N L	V Y P V Q V T N K
601/201	631/211
AAG AAG CAA GTT TTT TCC AAG ATC TTC TAC	TCG GAA GAC GAG GGC AAG ACG TGG AAG TTT
K K Q V F S K I F Y S	E D E G K T W K F
661/221	691/231
GGG AAG GGT ACG AGC GCT TTT GGC TGC TCT	GAA CCT GTG GCC CTT GAG TGG GAG GGG AAG
G K G R S A F G C S E	P V A L E W E G K
721/241	751/251
CTC ATC ATA AAC ACT CGA GTT GAC TAT CGC	CGC CGT CTG GTG TAC GAG TCC AGT GAC ATG
L I I N T R V D Y R R	R R L V Y E S S D M
781/261	811/271
GGG AAT TCG TGG CTG GAG GCT GTC GGC ACG	CTC TCA CGT GTG TGG GGC CCC TCA CCA AAA
G N S W L E A V G T L	S R V W G P S P K
841/281	871/291
TCG AAC CAG CCC GGC AGT CAG AGC AGC TTC	ACT GCC GTG ACC ATC GAG GGA ATG CGT GTT
S N Q P G S Q S S F T	A V T I E G M R V
901/301	931/311
ATG CTC TTC ACA CAC CCG CTG AAT TTT AAG	GGA AGG TGG CTG CGC GAC CGA CTG AAC CTC
M L F T H P L N F K G	R W L R D R L N L
961/321	991/331
TGG CTG ACG GAT AAC CAG CGC ATT TAT AAC	GTT GGG CAA GTA TCC ATT GGT GAT GAA AAT
W L T D N Q R I Y N V	G Q V S I G D E N
1021/341	1051/351
TCC GCC TAC AGC TCC GTC CTG TAC AAG GAT	GAT AAG CTG TAC TGT TTG CAT GAG ATC AAC
S A Y S S V L Y K D D	K L Y C L H E I N
1081/361	1111/371
AGT AAC GAG GTG TAC AGC CTT GTT TTT GCG	CGC CTG GTT GGC GAG CTA CGG ATC ATT AAA
S N E V Y S L V F A R	L V G E L R I I K
1141/381	1171/391
TCA GTG CTG CAG TCC TGG AAG AAT TGG GAC	AGC CAC CTG TCC AGC ATT TGC ACC CCT GCT
S V L Q S W K N W D S	H L S S I C T P A
1201/401	1231/411
GAT CCA GCC GCT TCG TCG TCA GAG CGT GGT	TGT GGT CCC GCT GTC ACC ACG GTT GGT CTT
D P A A S S S E R G C	G P A V T T V G L

FIGURA 5, continuación

1261/421
 GTT GGC TTT TTG TCG CAC AGT OCC ACC AAA ACC GAA TGG GAG GAT GCG TAC GGC TGC GTG
 V G F L S H S A T K T E W E D A Y R C V
 1321/441
 AAC GCA AGC ACG GCA AAT CCG GAG AGG GTT CCG AAC GGT TTG AAG TTT GCG GGG GTT GGC
 N A S T A N A E R V F N G L K F A G V G
 1381/461
 GGA GGG GCG CTT TGG CCG GTG AGC CAG CAG GCG CAG AAT CAA CCG TAT GGC TTT GCA AAC
 G G A L M P V S Q Q G Q N Q R Y R F A N
 1441/481
 CAC GCG TTC ACC GTG GTG GCG TCG GTG ACC AAT CAC GAG GTT CCG AGC GTC GCG AGT CCT
 H A F T V V A S V T I H E V P S V A S P
 1501/501
 TTG CTG GGT GCG AGC CTG GAC TCT TCT GGT GGC AAA AAA CTC CTG GGG CTC TCG TAC GAC
 L L G A B L D S S G G R K L L G L S Y D
 1561/521
 GAG AGG CAC CAG TGG CAG CCA ATA TAC GGA TCA ACG CCG GTG ACG CCG ACC GGA TCG TGG
 E R H Q W Q P I Y G S T P V T P T G S W
 1621/541
 GAG ATG GGT AAG AGG TAC CAC GTG GTT CTT ACG ATG CCG AAT AAA ATT GGC TCC GAG TAC
 E M G K R Y H V V L T H A N K I G S E Y
 1681/561
 AAT GAT GGA GAA CCT CTG GAG GGT TCA GGG CAG ACC GTT GTG CCA GAC GAG AGG ACC CCT
 I D G E P L E G S G Q T V V P D E R T P
 1741/581
 GAC ATC TCC CAC TTC TAC GTT GGC GGG TAT AAA AGG AGT GAT ATG CCA ACC ATA AGC CAC
 D I S H F Y V G G Y K R S D M P T I S H
 1801/601
 GTG ACG GTG AAT AAT GTT CTT CTT TAC AAC CGT CAG CTG AAT GCC GAG GAG ATC AGG ACC
 V T V N N V L L Y N R Q L N A E E I R T
 1861/621
 TTG TTC TTG AGC CAG GAC CTG ATT GGC ACG GAA GCA CAC ATG GAC AGC AGC ACC GAC ACG
 L F L S Q D L I G T E A H M D S S S D T
 1921/641
 AGT GCC AGT GCC CAC GGT ACG CCC TCA ACT CCC GTT GAC AGC ACT GCC CAC GGT AGG CCC
 S A S A H G T P S T P V D S T A H G T P
 1981/661
 TCG ACT CCC GCT GAC AGC AGT GCC CAC AGT ACG CCC TCG ACT CCC GCT GAC AGC AGT GCC
 S T P A D S S A H E T P S T P A D S S A
 2041/681
 CAC AGT ACG CCC TCG ACT CCC GTT GAC AGC AGT GCC CAC AGT ACG CCC TCG ACT CCC GCT
 H S T P S T P V D S S A H S T P S T P A
 2101/701
 GAC AGC AGT GCC CAC AGT ACG CCC TCG ACT CCC GCT GAC AGC AGT GCC CAC AGT ACG CCC
 D S S A H S T P S T P V D S S A H S T P
 2161/721
 TCA ACT CCC GTT GAC AGC ACT GCC CAC GGT ACG CCC TCG ACT CCC GCT GAC AGC AGT GCC
 S T P V D S T A H G T P S T P A D S S A
 2221/741
 CAC AGT ACG CCC TCA ACT CCC GTT GAC AGC AGT GCC CAC AGT ACG CCC TCG ACT CCC GCT
 H S T P S T P V D S S A H S T P S T P A
 2281/761
 GAC AGC AGT GCC CAC AGT ACG CCC TCA ACT CCC GTT GAC AGC AGT GCC CAC AGT ACG CCC
 D S S A H S T P S T P V D S S A H S T P
 2341/781
 TCG ACT CCC GCT GAC AGC AGT GCC CAC GGT ACG CCC TCG ACT CCC GCT GAC AGC AGT GCC
 S T P A D S S A H G T P S T P V D S S A
 2401/801
 CAC AGT ACG CCC TCA ACT CCC GCT GAC AGC AGT GCC AAT GGT ACG GTT TTG ATT TTG CCC
 H S T P S T P A D S S A N G T V L I L P
 2461/821
 GAT GGC GCT GCA CTT TCC ACC TTT TCG GGC GGA GGG CTT CTT CTG TGT GCG TGT GCT TTG
 D G A A L S T F S G G L L L C A C A L
 2521/841
 CTG CTG CAC GTG TTT TTT ACG GCA GTT TTT TTC TGA
 L L R V F F T A V F F *

FIGURA 5