

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 773**

51 Int. Cl.:

C12N 1/11	(2006.01)
C07K 16/20	(2006.01)
C07K 14/44	(2006.01)
A61K 39/002	(2006.01)
A61K 35/68	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2009 PCT/IB2009/055470**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO10064204**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009 E 09799724 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2364156**

54 Título: **Protozoo modificado que expresa al menos dos proteínas variables de superficie (VSP), vacuna que lo comprende, procedimientos, usos y métodos**

30 Prioridad:

02.12.2008 US 119058 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.05.2018

73 Titular/es:

CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET) (50.0%)
5 j "Fjj UXUj jU% \$* ' 'XYdrc":
6 i Ybcg'5 jfYg'7 %\$' ' 55 >ž5 F'm
l B=J9FG=8 5 8 '7 5 Hé @7 5 '89 '7 é F8 C6 5 fl 7 7 Ł
f) \$* \$i Ł

72 Inventor/es:

LUJAN, HUGO DANIEL

74 Agente/Representante:

ALBERTO, Paz Espuche

ES 2 667 773 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

5 Protozoo modificado que expresa al menos dos proteínas variables de superficie (VSP), vacuna que lo comprende, procedimientos, usos y métodos

10 La presente invención se refiere a protozoos modificados *Giardia* que expresa más de una proteína variable de superficie (VSP), y vacuna que lo comprende. Más específicamente se refiere a protozoos parásitos modificados que comprenden la expresión simultánea en su superficie de más de una proteína variable de superficie (VSP). Los protozoos modificados pueden también expresar en forma simultánea más de una proteína variable de superficie. Los protozoos muestran una expresión reducida de las enzimas Dicer, ARN polimerasa RNA dependiente (RdRP) o ambas, en donde el gen RdRP y/o el gen Dicer ha sido silenciado.

Antecedentes

15 La variación antigénica es un cambio fenotípico clonal desarrollado por microorganismos patógenos, que involucra determinantes antigénicos expuestos en la superficie. Estos organismos, utilizan diferentes mecanismos para cambiar la expresión de sus antígenos de superficie para, de esta manera, mantener la infección crónica bajo la continua presión inmune generada por su huésped (Deitsch, K. W., Moxon, E. R. & Wellem, T. E. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 281–293 (1997)). *Giardia lamblia* (también llamada *Giardia intestinalis* o *Giardia duodenalis*) es uno de los parásitos intestinales más comunes en humanos. El protozoario *G. lamblia* también sufre variación antigénica (Adam, R. D. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447–475 (2001) y Nash, T. E. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 352, 1369–1375 (1997) - proceso que le permite al parásito desarrollar infecciones crónicas y/o recurrentes. De un repertorio de aproximadamente 190 genes que codifican las proteínas variables de superficie (VSPs), *Giardia* expresa solamente una VSP en la superficie de cada parásito en un momento particular, pero espontáneamente cambia a una VSP diferente por un mecanismo desconocido. En *Giardia*, la variación antigénica es responsable por el variable y/o persistente curso de algunas infecciones así como también la propensión para múltiples infecciones e involucra a la familia de proteínas llamadas VSPs (Adam, R. D. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447–475 (2001) y Nash, T. E. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 352, 1369–1375 (1997).

20 Las VSPs recubren la superficie completa de los trofozoítos y son los principales antígenos reconocidos por el sistema inmune del huésped. El tamaño de las VSPs varía entre los 30 kDa y los 200 kDa; poseen una región amino terminal variable rica en cisteínas y una región carboxi-terminal conservada que incluye un dominio transmembrana hidrofóbico y una cola citosólica corta compuesta de sólo 5 amino ácidos (CRGKA). El genoma del parásito presenta un repertorio de ~190 genes que codifican para VSPs (Morrison, H. G. y otros, Science 317, 1921–1926 (2007), pero solamente una VSP se expresa en un momento dado en la superficie de cada trofozoíto. El cambio en la expresión de una VSP a otra ocurre una vez cada 6 – 13 generaciones, aún en ausencia de cualquier tipo de presión inmunológica (Nash, T. E., Alling, D. W., Merritt, J. W. Jr & Conrad, J. T. Exp. Parasitol. 71, 415–421 (1990). De forma similar a los demás genes de *G. lamblia*, los genes que codifican las VSPs no poseen intrones y sus regiones corriente arriba son relativamente cortas y se ha descrito que no poseen conservación de secuencia o que ésta es muy limitada. Más aún, no se encuentran presentes promotores eucarióticos típicos en estas regiones. Las regiones 3' no traducidas de los ARN mensajeros que incluyen a los genes VSPs de *Giardia* también tienden a ser cortos, típicamente su longitud oscila entre los 0 y los 30 nucleótidos. Hasta el momento no se ha demostrado que los procesos de rearreglo genético o los mecanismos de encendido/apagado promotor-dependientes estén involucrados en el cambio antigénico en *Giardia* (Adam, R. D. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447–475 (2001); Nash, T. E. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 352, 1369–1375 (1997) y Nash, T. E., Alling, D. W., Merritt, J. W. Jr & Conrad, J. T. Exp. Parasitol. 71, 415–421 (1990).

25 Carranza y otros., "Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation", INFECTION AND IMMUNITY, vol 70, no. 9, Septiembre 2002, páginas 5265-5268, divulga la expresión simultánea de proteínas de más de una VSP en la superficie de trofozoítos de *Giardia Lamblia* enquistados, es decir, durante la diferenciación de trofozoítos de *Giardia* en quistes.

Breve descripción de la invención

30 Se presentan protozoos parásitos modificados *Giardia* que comprenden la expresión simultánea en su superficie de más de una proteína variables de superficie (VSP). Los protozoos muestran una expresión reducida de las enzimas Dicer, ARN polimerasa RNA dependiente (RdRP) o ambas, en donde el gen RdRP o el gen Dicer ha sido silenciado, o una mezcla de ambos.

35 Se presenta una vacuna contra infecciones producidas por protozoos de *Giardia* que comprende al menos protozoos modificados que expresan en su superficie al menos dos proteínas variables de superficie (VSP). Los protozoos muestran una expresión reducida de las enzimas Dicer, ARN polimerasa RNA dependiente (RdRP) o ambas, en donde el gen RdRP o el gen Dicer ha sido silenciado, o una mezcla de ambos. La vacuna puede además comprender excipientes y/o adyuvantes.

Se presenta un procedimiento, no según la invención, para purificar el repertorio total de proteínas de superficie variable (VSP) de protozoos que comprende:

- 5 a) unir un anticuerpo que reconoce la secuencia de aminoácidos CRKGA de las VSP a un soporte sólido;
- b) contactar el soporte sólido con protozoos; y
- 10 c) separar el repertorio total de proteínas de superficie variable (VSP). Los protozoos pueden ser una mezcla de clones de protozoos salvajes, en donde cada clon expresa una proteína de superficie variable diferente o pueden ser un clon que expresan todo el repertorio de VSPs.

Se proporciona una vacuna, no según la invención, que comprende más de una proteína variables de superficie de protozoos, en donde cada una de dichas proteínas es diferente; y excipientes y/o adyuvantes. En una realización preferida la vacuna comprende el repertorio completo de proteínas variables de la superficie de protozoos, en donde cada una de dichas proteínas es diferente.

Se proporciona un método, no según la invención, de inmunización que comprende administrar a un mamífero una cantidad de una vacuna que comprende protozoos modificados que expresan al menos dos proteínas de superficie variable (VSP) o expresan simultáneamente el repertorio completo de VSPs del protozoo. El método se aplica para inmunizar un mamífero contra las infecciones producidas por protozoarios, en donde dichos protozoarios tienen un mecanismo de variación antigénica.

Se proporciona además un método, no según la invención, de inmunización que comprende administrar a un mamífero una cantidad de una vacuna que comprende una combinación de proteínas variables de superficie de protozoos, en donde la combinación de proteínas variables de superficie se aíslan de un protozoo modificado que comprende silenciados a los genes RdRP, Dicer o ambos. El método se aplica para inmunizar un mamífero contra las infecciones producidas por protozoarios, en donde dichos protozoarios tienen un mecanismo de variación antigénica. En una realización la dosis a administrar de la vacuna comprende entre 50 y 500 µg de proteínas variables de superficie de protozoos.

Se proporciona una secuencia de nucleótidos, no según la invención, en donde dicha secuencia puede ser elegida entre una cualquiera de las secuencias SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 112, en donde dichas secuencias son ARNdc.

Se proporciona el uso de al menos una secuencia, no según la invención, elegida entre una cualquiera de las secuencias SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 112 para silenciar al gen RdRP o para silenciar al gen Dicer.

Descripción de las figuras

En la figura 1 se muestra que en *Giardia*, son transcriptos simultáneamente varios genes de VSPs; a: ensayo de nuclear run-on usando núcleos recién aislados de *Giardia* inducidos a transcribir *in vitro* en presencia de [32P] UTP; b: análisis de Northern blot de ARN total extraído de los clones WB9B10 y WB1267 utilizando una sonda que comprende la región conservada presente en todas las VSPs; c: los transcriptos sentido y antisentido (vsp9B10, vsp1267, vspA6, vspH7, cwp2 y GDH) generados *in vitro*, fueron bloteados e hibridados con los productos de los ensayos de nuclear run-on bajo las mismas condiciones que en la figura 1a; d: Comparación entre los productos de PCR generados a partir de trofozoítos del clon WB9B10 con cebadores específicos (9B10F / 9B10R y 1267F/1267R) sobre el ADN genómico (calles 1 y 5), o cADN generado ya sea con cebador reverso R2 (calles 2 y 6) o cebador sentido S1 (calles 3 y 7), la calle 4 es un control de reacción sin RT, la flecha blanca indica el fragmento vsp9B10, que está presente en de ADN genómico y en el cDNA sentido de pero no en el cADN antisentido, la flecha de color negro indica el fragmento vsp1267 que esta presente en el ADN genómico, en el cADN sentido y en el cADN antisentido. M significa marcador molecular.

La figura 2 muestra las nuevas herramientas para el estudio de la variación antigénica en *G. lamblia*. a: Se generaron oligonucleótidos adecuados para amplificar por PCR un gran número de genes codificantes para VSP; las secuencias de cuatro VSPs de *G. lamblia* aislados de WB (VSP1267, VSP9B10, y VSPA6) y GS (VSPH7) fueron seleccionados, estas cuatro secuencias de VSP fueron alineadas y las regiones conservadas fueron utilizadas para el diseño de cebadores; las flechas debajo de las secuencias de oligonucleótidos ponen de relieve las secuencias que los cebadores genéricos de VSP (S1-S4 y R1 - R2) fueron diseñados; b: se empleó la combinación de cuatro cebadores sentido (S1-S4) y dos reversos (R1, R2) en el análisis por PCR de ADN genómico perteneciente al clon de *Giardia* WB9B10, que sólo expresa VSP9B10 en su superficie, se amplificaron varios fragmentos de ADN independientemente de las combinaciones de cebadores utilizados y cincuenta y nueve productos principales de estas reacciones se aislaron, clonaron y secuenciaron revelando que todos ellos codificaban fragmentos de VSP, varios de estos productos (etiquetados 1 a 8 en blanco) fueron utilizados posteriormente como sondas para el escrutinio de una biblioteca de ADN genómico, lo que permitió identificar ORFs (marcos de lectura abiertos) que codifican proteínas nuevas con características típicas de VSPs de *Giardia* (VSPS1-S8, números de acceso

- GenBank: AY142122 a AY142129), los marcadores de tamaño en nt (nucleótidos) se indican a la izquierda. c: para comprobar si el silenciamiento de los transcritos de VSP de *Giardia* implicaba la generación de ARN antisentido de VSP se buscaron estas moléculas en preparaciones de ARN aislados de trofozoítos que expresan una única VSP, las RT-PCR se llevaron a cabo con las mismas combinaciones de cebadores de VSP utilizado previamente en el ADN genómico pero utilizando cebadores sentido durante la reacción de transcripción reversa (RT), los cebadores sentido (S1 a S4) se muestran en la parte superior, las calles (a) a (h) indican las combinaciones de cebadores utilizados en cada reacción de PCR: (a) S1-R1, (b) S2-R1, (c) S3-R1, (d) S4-R1, (e) S1-R2, (f) S2-R2, (g) S3-R2, y (h) S4-R2, además se representan los controles negativos sin la transcriptasa reversa (RT-), en estas condiciones treinta y ocho productos amplificados fueron aislados, clonados y secuenciados, demostrando que codifican VSPs antisentido, doce de estos productos (marcados de 1 a 12 en blanco) también fueron utilizados como sondas en una biblioteca genómica, la cual permitió obtener la secuencia completa de nuevos genes de VSP (VSPAS1-VSPAS12, números de acceso GenBank AY143130 - AY142141), indicando los blancos funcionales de los transcritos antisentido de los genes de VSP.
- 15 La figura 3 muestra a: inmunolocalización de la versión de gRdRP etiquetada con un epítotope HA expresada en trofozoítos del clon WB9B10, la enzima (en rojo) localiza en una región que rodea ambos núcleos del parásito, esta región se corresponde principalmente con el retículo endoplasmático rugoso (amarillo) como se ve por la co-inmunolocalización con la chaperona ER-BiP (Mab 9C9, en verde); b: actividad RdRP en donde se utilizaron diferentes combinaciones de los sustratos de ARN (A, B y D, vsp9B10 y vsp1267, C y E, vsp9B10, vsp1267 y vspH7), en ausencia (A-C) o la presencia del cebador R1 (D) o R2 (E), A es un control sin RdRP purificada. c: inmunolocalización de una versión de gDicer etiquetada con un epítotope HA expresada en trofozoítos del clon WB9B10, la enzima (en verde) localiza en el citoplasma de la célula, los núcleos están teñidos con DAPI (azul); d: inmunolocalización de una versión de gAgo señalizada con un epítotope HA, la cual se expresó en trofozoítos del clon WB9B10, la enzima (en verde) se localiza en el citoplasma celular, los núcleos son teñidos con DAPI (azul); e: Northern blot con sondas para gRdRP, gAgo, gDicer, GDH y CWP1 sobre ARN total extraído de trofozoítos del clon WB9B10 inducidos al enquistamiento por 4, 6 o 12 h, y trofozoítos mantenidos en un medio de crecimiento normal (NT) durante 12 h., los resultados muestran la expresión constitutiva de estos componentes PTGS (post transcriptional gene silencing – silenciamiento génico post transcripcional).
- 30 La figura 4 muestra la actividad Dicer y la detección de pequeños ARN de VSP en *Giardia*. a: generación de pequeños ARNs a partir de ARNdc por parte de extractos de *Giardia* demostrando una actividad tipo Dicer. Para ARNdc de vsp1267, ambas hebras (calle 1), sólo la hebra de ARN sentido (calle 2) o sólo la antisentido (calle 3) fueron marcados radiactivamente. Para vsp9B10 y gdh ambas hebras fueron marcadas. ARNs de doble cadena fueron incubados con un extracto de *Giardia* perteneciente al clon WB9B10 a 37°C durante 1 h; luego, el ARN total fue aislado y con el se realizó una electroforesis. En todos los casos, se produjeron ARN pequeños; b: efecto de la presencia de ATP en el procesamiento de ARNdc por *Giardia*, los calles 1 y 2 muestran los controles no tratados: la incubación ARNdc de vsp1267 con lisados citoplasmáticos de *Giardia* sin el agotamiento de ATP (1h y 3 h de incubación, respectivamente), disminución de ATP mediante la adición de 2 mM de glucosa y 0.1U μL^{-1} de hexoquinasa (calle 3). Regeneración de ATP utilizando fosfocreatina (CP, calle 4), creatina quinasa (CK, calle 5), o ambos (calle 6); c: generación de pequeños ARNs por incubación de ribosondas de VSP con extractos del clon WB9B10 de *Giardia*. Uno, dos o tres diferentes ARNm de VSP (vsp9B10, vsp1267, vspH7) fueron mezclados con los extractos de *Giardia*. La formación de pequeños ARNs se produjo cuando más de un transcripto estaba presente. Se utilizó gdh como control de gen no relacionado. Los marcadores de tamaño de ARN en nucleótidos están a la izquierda; d: ARN total del clon WB9B10 y de trofozoítos del clon WB1267 así como ARN de bajo peso molecular (LMW- low molecular weight) del clon WB1267 se sometieron a electroforesis, bloteados e hibridizados utilizando sondas parcialmente digeridas de ARN de vsp9B10 transcripto in-vitro. En el clon WB9B10 no se encontraron ARN pequeños, en contraste, pequeños ARNs de vsp9B10 estaban presentes en el clon WB1267 (flecha), el cual no expresa VSP9B0. Curiosamente también se pudo observar RNA de 70-nucleótidos de largo (asterisco), que podrían representar ARNm parcialmente digerido.
- 50 La figura 5 muestra la generación de pequeños ARNs por incubación de ribosondas de VSP con extractos de *Giardia* del clon WB1267, uno, dos, o tres ARNm de VSP diferentes (vsp9B10, vsp1267, vspH7) fueron mezclados y confrontados a los extractos de trofozoítos de *Giardia*, se produjeron pequeños ARN marcados con [32P] cuando más de un transcripto estaba presente, los marcadores de tamaño de ARN en nucleótidos están a la izquierda.
- 55 La figura 6 muestra la conmutación antigénica en trofozoítos de WB9B10 que sobreexpresan VSPH7. a: los trofozoítos del clon WB9B10 fueron transfectados con el vector pTubCWP1.Pac o con el vector pTubH7.Pac, que dirigen la expresión de CWP1 o VSPH7 bajo el control del promotor de la α -tubulina, los controles pertenecientes a trofozoítos pertenecientes a la cepa GS que expresan la VSP H7 transfectados con el vector control (pTubCWP1.Pac) indicados mediante triángulos invertidos, los cuadrados muestran trofozoítos WB9B10 transfectados con el vector control, la expresión de la VSP 9B10 disminuye con el tiempo debido a recambio espontáneo de las proteínas de superficie, los trofozoítos WB9B10 que expresan constitutivamente vspH7 muestran que la expresión de VSP9B10 (círculos) o VSPH7 (triángulos) disminuye más rápido que el respectivo control, Los resultados representan el porcentaje promedio de tres experimentos independientes \pm SD. b: Imagen representativa de trofozoítos de WB9B10 que expresan VSPH7 a tiempo 0, todas las células expresan simultáneamente en su

superficie VSP9B10 y VSPH7; c: imagen representativa de trofozoítos de WB9B10 que expresan VSPH7 después de 15 días en cultivo, algunas células expresan en su superficie VSP9B10 y VSPH7, otros sólo VSP9B10 o VSPH7 y otros ninguno de ellos, los núcleos fueron marcados con DAPI en azul;

5 La figura 7 muestra la conmutación antigénica en trofozoítos de WB9B10 que expresan fragmentos antisentido de vsp9B10. a: trofozoítos del clon WB9B10 fueron transfectados con el vector pTubCWP1.Pac (cuadrados) o el vector pTubPac incluyendo las secuencias antisentido de la porción media del gen vsp9B10 5' (círculo) o 3' (triángulo), los resultados representan el valor promedio de tres experimentos independientes \pm SD e indican que el número de trofozoítos positivos para la VSP 9B10 disminuyen más rápidamente que el control; b: imagen representativa de trofozoítos WB9B10 transfectados con un gen de VSP diferente, todas las células expresan en su superficie VSP9B10; c: imagen representativa de trofozoítos WB9B10 que expresan el fragmento antisentido 3' de vsp9B10 después de 15 días de cultivo, VSP9B10 está presente en aproximadamente el 50% de la población, los núcleos fueron marcados con DAPI en azul.

15 La figura 8 muestra que las variaciones en la concentración de los diferentes transcriptos puede determinar cual evade el sistema silenciador, los genes codificantes para vsp1267, vsp9B10, y cwp1 fueron clonados en el vector pGEM-T-easy y transcriptos in vitro en presencia o ausencia de 32P-UTP, se incubaron diferentes concentraciones de transcriptos de vsp9B10 y CWP1 sin marcar durante diferentes periodos con extractos citoplasmáticos de WB1267 que contenía una concentración fija de ARN de vsp1267 marcado radioactivamente, calle 1: Marcador de decenas de nucleótidos (Decade- Ambion), calles 2, 3 y 4: incubación de 750 ng de vsp9B10 y 250 ng de vsp1267 (relación 3:1), 1, 5 y 24 h, respectivamente, calles 5, 6 y 7: incubación de cantidades iguales de vsp9B10 y vsp1267 (250 ng de cada uno; proporción de 1:1), 1, 5 y 24 h, respectivamente, calles 8 y 9: incubación de 750 ng de CWP1 y 250 ng de vsp1267, 5 y 24 h, respectivamente, calle 10: incubación de 250 ng del transcripto de vsp1267, en tiempos de incubación corto (1 h) hay poca degradación de vsp1267 en el clon WB1267, independientemente de la cantidad de vsp9B10 agregada a la mezcla (calles 2 y 5), en contraste, después de incubaciones más largas (5 hs) la aparición de ARNs pequeños radiomarcados de vsp1267 aumenta por la presencia de vsp9B10 (comparar calle 10 con las calles 3, 6 y 8), la presencia de transcriptos de CWP1 (no relacionados) no tiene ningún efecto, incluso a alta concentración (calle 8). A las 24 hs de incubación, la mayoría de los transcriptos radiomarcados están completamente degradados;

30 La figura 9 muestra los resultados del silenciamiento del gen Dicer y RdRP en trofozoítos de *Giardia*, en donde los clones de *Giardia* de Dicer-AS y RdRP-AS presentan una reducción de los niveles de ARN mensajeros de entre el 65% y 75% en comparación con trofozoítos WB9B10 no transfectados medido por medio de ensayos de densitometría de las bandas obtenidas por RT-PCR y Northern blot realizados por quintuplicado, los resultados representan el valor promedio \pm s.d.

La figura 10 muestra la expresión de VSPs diferentes en trofozoítos transgénicos de *Giardia* con las enzimas RdRP y Dicer silenciadas, a: ensayos de inmunofluorescencia directos en trofozoítos transfectados con Dicer-AS (panel inferior) o vector vacío (panel superior) utilizando TRITC conjugado al anticuerpo monoclonal 5C1 (VSP1267; panel derecho) y FITC conjugado al anticuerpo monoclonal 9B10 (VSP9B10; panel de la izquierda), cuando la expresión de Dicer en *Giardia* fue silenciada, los trofozoítos que expresaban VSP9B10 en la superficie también expresaron VSP1267 (imagen fusionada; panel central); b: porcentaje de trofozoítos de *Giardia* que expresan una VSP en particular, según lo determinado por ensayos de citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales específicos (VSP9B10, anticuerpo monoclonal 9B10; VSP1267, anticuerpo monoclonal 5C1; VSPA6, anticuerpo monoclonal 6E7) en los clones 9B10, 1267, y con células transfectadas con construcciones antisentido para RdRP (RdRP-AS) o *Giardia* Dicer (Dicer-AS), se utilizaron como control negativo inmunoglobulinas de cabra anti-ratón; c: análisis de Western blot de los extractos de proteínas de tipo salvaje WB9B10 y trofozoítos WB9B10 en los cuales el gen Dicer ha sido noqueado, después de la electroforesis y la transferencia a nitrocelulosa, los filtros se hibridaron con: (1) el anticuerpo monoclonal 12F1 de la invención clon G3 (generado en contra el dominio de la CRGKA conservado en todas las VSPs) o (2) anticuerpos monoclonales 9B10 (específico para VSP9B10).

La figura 11 muestra la expresión de VSPs en clones salvajes de *Giardia* y en *Giardia* modificada con deregulación de la variación antigénica, se muestra imágenes de inmunofluorescencia confocal de trofozoítos a los cuales se ha silenciado Dicer (a) o RdRP (b) e imágenes representativas de los ensayos de inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos monoclonales anti-VSP (verde) contrastando con DAPI (azul), WB9B10 (d), WB1267 (e), y GS/M-H7 (f), y (c) imagen de inmunofluorescencia de una población no clonada WB aislada que fue teñida con el anticuerpo monoclonal 12F1 anti-CRGKA de la invención (verde) y contra coloreada con DAPI (azul).

La figura 12 muestra la detección y cuantificación de quistes de *Giardia* en muestras de deposiciones de jerbos infectados con diferentes poblaciones de trofozoítos salvajes y transgénicos, y desafiados con WB9B10 y WB1267. (a) Jerbos inicialmente infectados con poblaciones clonales de trofozoítos WB9B10, WB1267, o transgénicos que fueron silenciados para la expresión de Dicer (DAS) o RdRP (RAS) y mezclas 1:1 de ambos. (b-e) Jerbos previamente infectados con *Giardia* WB9B10 (b), WB1267 (c), DAS (d) y RAS (e) fueron desafiados dos meses después de la infección primaria con poblaciones clonales de WB9B10 y WB1267, se contó la cantidad de quistes liberados por los animales. Las figuras representan el valor medio de 5 experimentos diferentes;

La figura 13 muestra los resultados del desafío de los jerbos con trofozoítos que expresan una VSP particular a continuación de la infección primaria con trofozoítos de *Giardia* que expresan el repertorio completo de VSPs. Los jerbos previamente infectados con clones WB9B10, WB1267, DAS, o RAS (a-d) fueron desafiados con poblaciones de los clones WB9B10 (e-h), WB1267 (i-l), o quistes purificados (m-p). La figura muestra las imágenes representativas de los ensayos de inmunofluorescencia en heces de jervo usando anticuerpos monoclonales conjugados con FITC anti-CWP2 (verde).

La figura 14 muestra que el suero y el contenido del intestino de los jerbos infectados con trofozoítos transgénicos que expresan el repertorio total de VSPs son capaces de aglutinar *in vitro* diferentes clones de *Giardia*. Se muestran imágenes representativas de una microscopía por contraste de fase de los clones WB9B10 (1-2), WB1267 (3-4), y GS/M H7 (5-6) desafiados con suero (1b, 3f, y 5f) o contenido intestinal (2b, 4f, and 6f) de los animales infectados con clones WB9B10. Suero (2b y 1f), o contenido intestinal (3b y 2f) de animales infectados con clones WB1267. Suero o contenido intestinal de animales infectados con clones GS/M-H7 (5b and 6b). Mab específico para VSP9B10 (1c y 2c), Mab para VSP1267 (3c y 4c), Mab para VSPH7 (5c y 6c), suero de animales no infectados (1a, 2a, 3a, 4a, 5a, y 6a), suero de animales infectados con DAS noqueado (1d, 2d, 3d, 4d, 5d, y 6d), y suero de animales infectados con with RAS (1e, 2e, 3e, 4e, 5e, y 6e).

La figura 15 muestra la detección y cuantificación de quistes de *Giardia* en muestras de heces de jerbos previamente inmunizados con VSPs purificadas a partir de diferentes poblaciones clonales de trofozoítos salvajes y/o transgénicos de *Giardia* de la invención. Las heces de los jerbos inmunizados se monitorearon diariamente durante un mes utilizando anticuerpos monoclonales anti-CWP2 para verificar la liberación de quistes. Los jerbos fueron infectados con poblaciones clonales de trofozoítos WB9B10 o WB1267, las inmunizaciones se llevaron a cabo usando VSPs purificados de trofozoítos transgénicos de la invención DAS, RAS (y mezclas de ambos), los animales fueron previamente inmunizados con VSPs purificadas de DAS (a), RAS (b), o la mezcla de ambas (c), estos animales estuvieron protegidos a infecciones subsecuentes con los clones WB9B10 o WB1267, los animales control (d) o los inmunizados con la proteína intracelular (e) no estuvieron protegidos de las subsecuentes infecciones. Las figuras representan el valor medio de 5 experimentos independientes;

La figura 16 muestra en fotos la morfología del intestino delgado de los jerbos durante la infección y el desafío, el panel superior muestra el intestino delgado de los animales experimentales: (a) intestino de un jervo durante la infección primaria con trofozoítos que expresan el repertorio completo de los (DAS) después de 15 días de la inoculación, se puede observar un incremento en el tamaño de las placas de Peyer (flechas) en comparación con los animales control (b). (c) es el intestino durante le desafío de los jerbos inmunizados con VSPs purificadas de trofozoítos DAS, el panel de abajo muestra el examen microscópico del intestino delgado de los animales experimentales: (d) los jerbos infectados muestran un alargamiento de las placas de Peyer y una inflamación infiltrante moderada en la mucosa y submucosa. Se visualizaron algunos trofozoítos de *Giardia* en el lumen del intestino (asteriscos; 400X), (e) son los jerbos control no infectados/no vacunados (400X), (f) son los jerbos vacunados que muestran una mucosa intestinal histológicamente normal (400X), las inserciones muestran una morfología general del intestino delgado a 250X.

Descripción detallada

En la presente solicitud se entiende por trofozoíto a una célula de un estadio particular de un parásito unicelular, por ejemplo de un protozoo. A los efectos de la presente solicitud se entiende que el término trofozoíto, parásito, célula de parásito o protozoo tienen el mismo significado y son intercambiables

El parásito, trofozoíto o protozoo transgénico o modificado puede ser un protozoo al cual se le ha silenciado el gen Dicer o el gen RdRP o una mezcla de ambos protozoos transgénicos. Estos protozoos se denominan indistintamente en la presente solicitud como trofozoítos, protozoos o parásitos transgénicos, transfectados o modificados. Cuando ha sido silenciado el gen Dicer el trofozoíto o protozoo del a invención también puede ser denominado como Dicer-AS o DAS. Cuando ha sido silenciado el gen RdRP el trofozoíto o protozoo de la invención también puede ser denominado como RdRP-AS o RAS. Cuando se utiliza una mezcla de trofozoítos o protozoos transgénicos se los puede denominar como Dicer-AS + RdRP-AS ó DAS + RAS.

Los trofozoítos o protozoos que expresan el repertorio completo de proteínas variables de superficie puede ser cualquier protozoo parásito o patógeno a los cuales se les ha desregulado el mecanismo de variación antigénica.

Se muestra que la regulación de la expresión de VSPs en *Giardia* incluye un sistema que comprende, ARN-polimerasa ARN- dependiente, Dicer y Argonauta, los cuales son componentes de la maquinaria de ARN de interferencia. Los clones que expresan un único antígeno (proteína) en superficie, transcriben eficientemente varios genes que codifican VSPs pero sólo se acumulan los transcritos que codifican la VSP a ser expresada en la superficie de la célula.

La detección de ARN antisentido correspondiente a los genes de las VSP silenciadas y pequeños ARN de las proteínas silenciadas pero no de las VSP expresadas implican una vía de ARN de interferencia en la regulación de la

variación antigénica. Claramente, el silenciamiento tanto de las enzimas Dicer como ARN polimerasa dependiente de ARN conduce al cambio en la expresión de una única VSP a la expresión de múltiples VSPs en parásitos individuales.

5 Se realizaron ensayos de nuclear run-on para determinar si la regulación de la expresión de VSP está controlada a nivel transcripcional o postranscripcional. Luego se estudió en los trofozoítos la existencia de ARN, sentido y antisentido, que codificaran para VSP por la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) así como también la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de ARN de doble cadena (ARNdc) en eucariotas superiores, tales como ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), Dicer y Argonauta. La caracterización incluyó el clonado y expresión de estos genes así como también el análisis de los pequeños ARN generados de los ARNdc que codifican para VSPs. También se evaluó la expresión de diferentes VSP después del silenciamiento de los componentes de la ruta de ARN de interferencia (ARNi) de *Giardia*.

15 La disrupción de los mecanismos de variación antigénica para generar células que expresan el repertorio completo de proteínas variables de superficie en organismos patógenos no ha sido descrita aun. La expresión del repertorio completo de proteínas de superficie en organismos patógenos para generar parásitos que puedan ser utilizadas como vacunas, o la purificación del repertorio completo de proteínas variables de superficie para la inmunoprofilaxis de enfermedades causadas por estos patógenos no ha sido posible hasta el momento.

20 Transcripción de VSP en *Giardia*:

La transcripción de genes de VSP fue analizada por ensayos de nuclear run-on usando ARN aislado de núcleos pertenecientes a trofozoítos del clon WB9B10 (Fig. 1a), dicho clon expresa solamente VSP9B10 (número de acceso GenBank AAK97086) en su superficie. Los resultados indican que la mayoría de los genes que codifican para VSPs fueron simultáneamente transcritos. En contraste cuando el total de ARN extraído de dos clones diferentes de *Giardia* (WB9B10 y WB1267) fueron incubados con un oligonucleótido usado como sonda que correspondía con el extremo 3' conservado de los genes de VSP, se detectó solamente un transcripto de tamaño molecular correspondiente a la VSP que se expresa en la superficie de cada clon (Fig. 1b). Adicionalmente se observaron bandas de muy bajo peso molecular las cuales son atribuibles a procesos de degradación. Usando sondas específicas para cada VSP (ver Nash, T. E. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 352, 1369–1375 (1997) se observó la acumulación de un único transcripto en diferentes clones de *Giardia*. Esto muestra que un sólo transcripto de VSP se acumula, siendo más de un VSP transcripto en el núcleo del parásito.

35 Silenciamiento postranscripcional de genes en *Giardia* (PTGS)

Un paso clave en el PTGS es la producción de ARNdc que son homólogos con el gen silenciado. Ensayos con RT-PCR diseñados específicamente para amplificar productos VSPs, tanto sentido como antisentido, reveló, después del clonado y secuenciamiento de estos fragmentos, que ambas cadenas del ARN están presentes en los trofozoítos (Fig. 2). Para evaluar la posible transcripción simultánea de ARN sentido y antisentido de genes que codifican para VSP, se realizó un segundo experimento de nuclear run-on usando sondas sentido y antisentido específicas (Fig. 1c). En este ensayo fue imposible detectar ARN antisentido de VSP, lo que indica que aquellas moléculas podrían haber sido generadas postranscripcionalmente. También se analizaron los productos generados por PCR del clon WB9B10 usando cebadores específicos para vsp9B10 y vsp1267 (Fig. 1d). La banda correspondiente a vsp9B10 estaba presente en el ADN genómico y en el ADN sentido de la cadena complementaria pero pobremente en el antisentido de ADNc. En contraste, vsp1267, el cual no se expresa en la superficie del clon WB9B10, pudo ser amplificado del ADN genómico e igualmente amplificado en los cADN tanto sentido como antisentido. Estos resultados mostraron que los VSPs son transcriptos simultáneamente (confirmando los resultados de los experimentos de nuclear run-on) y que hay una baja abundancia de transcriptos antisentido para la VSP que se expresa y la presencia de ARN antisentido para las VSP que son transcriptas pero no traducidas.

50 Componentes de la maquinaria ARNi de *Giardia*:

La RdRP media la producción sin cebador de ARNdc a partir de ARNm aberrantes y la producción de ARNdc, con y sin cebador guiadas por ARN de interferencia pequeños (siRNA) que son necesarios en algunos organismos para activar el mecanismo de ARNi. Se identificó un homólogo de RdRP en *Giardia*. Este gen de RdRP codifica una proteína básica de 155.257 Da que comparte una alta homología con otras RdRP eucariotas y difiere enormemente del codificado por el virus 16 de *Giardia*, lo que indica la naturaleza protozoica del gen identificado.

60 La transcripción de la RdRP de la *Giardia* fue verificada por RT-PCR y por Northern blot, y su localización fue evaluada mediante la expresión de la misma fusionada a un tag de haemaglutinina (HA). La RdRP de *Giardia* estaría asociada a los ribosomas presentes en el lado citoplasmático del retículo endoplásmico. Más aun, la enzima está activa en los trofozoítos, debido a que es capaz de formar ARN de alto peso molecular *in vitro* en presencia de ARN homólogos de VSP (Fig. 3). Una característica del ARNi es la degradación de los ARNdc en siARN de 21-25 nucleótidos por la ARNasa de ARNdc específica Dicer. Previamente un homólogo de la Dicer de la *Giardia* fue

identificado, su estructura resuelta y se demostró la actividad in vitro de la Dicer recombinante (Macrae, I. J. y otros, Science 311, 195–198 (2006).

5 Usando la secuencia de Dicer-1 de *Drosophila* para buscar genes homólogos en la base de datos del genoma de la *Giardia* se pudo identificar varios clones con alto grado de homología a los dominios Dicer. Por PCR y posterior comparación con la biblioteca genómica, se observaron dos ORF independientes que contienen dominios presentes en las enzimas conocidas Dicer: Una proteína Argonauta con dominios PIWI y PAZ (gAgo, número de acceso GenBank AY142142), y una RNasa III bidentada (gDicer, número de acceso GenBank AY142144) que contiene un dominio PAZ y un motivo de cremallera leucina probablemente implicadas en la interacción de la enzima con otros componentes de RISC y con ARN, respectivamente.

15 De acuerdo a lo que se muestra en la figura 3 la enzima Dicer se expresa constitutivamente durante el ciclo de vida completo de *Giardia*, siendo su localización citoplasmática (Fig. 3). Para evaluar la actividad Dicer de *Giardia* se realizaron ensayos *in vitro*, en donde ARNdc radiomarcados fueron expuestos a extractos postnucleares de *Giardia*. Los resultados mostraron que (Fig. 4a), sin importar el gen y la hebra que esté marcada (sentido, antisentido o ambas), los ARNdc son procesados en pequeños fragmentos de ARN de 20 a 30 nucleótidos y este proceso es favorecido, como en los eucariotas superiores, por la presencia de ATP (Fig.4b). Además los pequeños ARN obtenidos fueron clonados en forma similar a los siARN que tienen 5'-P y 3'-OH terminales. El secuenciamiento de los siARN indicó que derivaban de los genes de VSP cargados y que poseen una longitud de 22-25 nucleótidos (Tabla 1).

Tabla 1:

VSP9B10 ARNs pequeños sentido	VSP9B10 ARNs pequeños antisentido
GTTTTGTTCTCGCGGGGTTACTCGT (SEQ ID N° 1)	ACCCCGCGGAGAACAAAAGTCC (SEQ ID N° 57)
AGAGCGCGCGGCTCAATGCGCAG (SEQ ID N° 2)	TCCTGCCCATGCAATCTGGACGA (SEQ ID N° 58)
GATTGCATGGGCAGGAAAAGCAA (SEQ ID N° 3)	ATTGAGCCGCGGCTCTGTTGCTTT (SEQ ID N° 59)
TCTCGATGTAACACAGGATTTGT (SEQ ID N° 4)	ATGCTTCCTCTGCGCAATTAGTGT (SEQ ID N° 60)
GGACAATGTGCAGACNNAGAAGG (SEQ ID N° 5)	CAATACAATTTACCACCGATCAG (SEQ ID N° 61)
AAAGATGGCTCCGGAGGCGATACA (SEQ ID N° 6)	TGCACATTGTCCATTGATAGGAA (SEQ ID N° 62)
CAGACCTGTGGACAGTGCGCCGAG (SEQ ID N° 7)	CTGATCAGCTGTATCGCCTCCGG (SEQ ID N° 63)
CTTTCATGTACAAGGGCGGCTGT (SEQ ID N° 8)	GTAACAGCCGCCCTTGTACATGA (SEQ ID N° 64)
CGAAGCANCCCAGCAGCCCGGACAG (SEQ ID N° 9)	CATCTGCCGCCNGACANNTGGTC (SEQ ID N° 65)
GCAAGGATACTTCGTGCCGCCGG (SEQ ID N° 10)	CCCGGCCGCACGAAGTATCCTTG (SEQ ID N° 66)
ACCAATCGGTCATACCATGCGGAG (SEQ ID N° 11)	ACCGATTGGTGAGAGGCGTCTGC (SEQ ID N° 67)
ACGATAAAAAGTACAAGGGCGTGCT (SEQ ID N° 12)	ACTTTTTATCGTTCTTAACTGTTA (SEQ ID N° 68)
ACCGGCACCAAGACGTGCAAGAC (SEQ ID N° 13)	TGTGGGAGCGTAACACCGAGTGC (SEQ ID N° 69)
TGCGACGTGCGAGAAGGGCGCCGA (SEQ ID N° 14)	CACGCAGTACACGTGGCGGCCTT (SEQ ID N° 70)
GCCCGACCCNAGTGCAACACCCCC (SEQ ID N° 15)	CACGCAGGAGGTGGCTGAGTCTT (SEQ ID N° 71)
GTGCAAGACGTGCAGTGAGCCGA (SEQ ID N° 16)	GTGCCGTGCACTCTTCTTCTGT (SEQ ID N° 72)
AGCTAAGCAAGGAGGTGTGCNCA (SEQ ID N° 17)	TTGTTTGGCTGGACCTTCTTATT (SEQ ID N° 73)
ACGGTTGTGAGCACCTGGAAGGC (SEQ ID N° 18)	GCACTCACCGTCTCCGGGCCTTT (SEQ ID N° 74)
CCTGTGCCAAGTGCAATACCTCG (SEQ ID N° 19)	GCTTCTTCGTGCACCCGGTGCC (SEQ ID N° 75)
AGCTACGAAGGAGAGGGCACGGGG (SEQ ID N° 20)	CTGGTGCCCTCGTAGTNNCCTNCC (SEQ ID N° 76)
TCGGCCCGCACAGCCTCCTGCCAG (SEQ ID N° 21)	TGAGGACCTGCTTAGGCTCGCAG (SEQ ID N° 77)
ACGAAACGACCAANCTCCCTGGAA (SEQ ID N° 22)	CTTCTTGACNCACACGCCGTTCTC (SEQ ID N° 78)
TGAATAATGGCGCGCTCATCACTTG (SEQ ID N° 23)	TAGCAGCCCCGTTTCATGCGGAA (SEQ ID N° 79)
GATGTAAGACGTGCACCAGCCAG (SEQ ID N° 24)	ACCTCCTCACAGACGCTCTTTCCA (SEQ ID N° 80)
TACTACCTGTCCAAAGAAAAGTG (SEQ ID N° 25)	GCTTGTATCCGTCGGCCGGAGTC (SEQ ID N° 81)
CCCCAACCAACAATAAAGGGCC (SEQ ID N° 26)	CACTCGGAGCACCCAGTGCGCA (SEQ ID N° 82)
ACCTCATAACAGAACANNAACAGG (SEQ ID N° 27)	CACTTGGTGCGCTCGTCCGCATTG (SEQ ID N° 83)
GGGATCTCCGTGCTGTATCGC (SEQ ID N° 28)	ACAGCGNCGGAGATCCCCGCTATGG (SEQ ID N° 84)
TGCTGGTGGTTCATATGTAGNGG (SEQ ID N° 29)	AGAGGAAGCCCACGAGGCCCCC (SEQ ID N° 85)
VSP1267 ARNs pequeños sentido	VSP1267 ARNs pequeños antisentido
GCAAGCACTCTTGAGGAGCTT (SEQ ID N° 30)	GGCAATTAATTAATAGAAACAT (SEQ ID N° 86)
GCTCTACGACTCAGGCTAATTGT (SEQ ID N° 31)	GCTATTAGGCAATTAATTAATAG (SEQ ID N° 87)
CAACGGGGTGTGTGAAGCAGCCGC (SEQ ID N° 32)	TTCCGCAACACAATTAGCCTGAG (SEQ ID N° 88)
GGCTGCTAATGGTAGTGATAACG (SEQ ID N° 32)	TGCACTTTGTATTACTACTGGCG (SEQ ID N° 89)

GTAAGAAGTGCCTTCTGCAAACC (SEQ ID N° 33)	GCACTTCTTACAAGTCTGATCAG (SEQ ID N° 90)
CAAACCTTCATGTTCAAGGGCGG (SEQ ID N° 34)	TTAAATTACCAGTNNCTCCCGCT (SEQ ID N° 91)
TGATGCTGCCTCTGGTACTACTGG (SEQ ID N° 35)	ATTACTCTCACCAATCGTGACCCC (SEQ ID N° 92)
GCGGCTGATACCACGGATTCTGT (SEQ ID N° 36)	GCGTNATCATTAGGGAAATATCC (SEQ ID N° 93)
CAACTGGGGTCACGATTGGTGAG (SEQ ID N° 37)	TTAAGGGNNCTCAGGCTATTTCGTG (SEQ ID N° 94)
ACTAATTGCGTTNNGTGTACCAA (SEQ ID N° 38)	TCAGGACAGACCCNGGGTAGCAG (SEQ ID N° 95)
GAGTGTGCTTCCAATCTGTATCTG (SEQ ID N° 39)	CGTCGGCGCAGTTTTCCAATAC (SEQ ID N° 96)
GAAACTTGCAAGACAGGATATTTCC (SEQ ID N° 40)	AGTGCAAACCTCCGTTGGTTTTATCC (SEQ ID N° 97)
TTTCNTAATGATAACGCTGATA (SEQ ID N° 41)	GCATCGGCTGTCGTGCACAACGT (SEQ ID N° 98)
CCGGTGCTATTCTTATCACCTGCA (SEQ ID N° 42)	GCCGCTGGTCTNGACGTAGCAGG (SEQ ID N° 99)
GCAAGGACGACAACACTGCGGCC (SEQ ID N° 43)	
GTATCGCAGAGTGCACGGGAANG (SEQ ID N° 44)	
GGCAGTGCACAGCTAGCATAGCAG (SEQ ID N° 45)	
CCTTTGCGTGTCCGGCCGAAACAG (SEQ ID N° 46)	
TAAAACCAACGGAGTTTGCCTGCC (SEQ ID N° 47)	
CTATCAGGCTGAGAAGTTTCTGT (SEQ ID N° 48)	
GCAGGAAAGTGCACGACCTGTGCG (SEQ ID N° 49)	

VSPH7 ARNs pequeños sentido	VSPH7 ARNs pequeños antisentido
GGAAACCTTGGTAGGATTATTTGC (SEQ ID N° 50)	AGTCGTAGAGCAAGCTCCTGCAAG (SEQ ID N° 100)
AATGCTAATCTGTACCTGAAGGCT (SEQ ID N° 51)	ACCCCGTTGATGGGCACATAGTTT (SEQ ID N° 101)
GGCATAGATGGGTGCTCTGCATG (SEQ ID N° 52)	CTTCCGTCTTNNAAATAATCCTACC (SEQ ID N° 102)
ACAAAGGGAACATGCATTGCAGA (SEQ ID N° 53)	GAATCGTAACCCCGGTTGCGTCG (SEQ ID N° 103)
ACGCCGGATAANACCAACGGAGTT (SEQ ID N° 54)	ACTTAGCACAACCCGGCCACACC (SEQ ID N° 104)
TGTGCAANNGATAACACTAANA (SEQ ID N° 55)	CTTATCAGCCGTAACAGGTAAG (SEQ ID N° 105)
CTCGTCCGGCTTCTCTGCTGGTG (SEQ ID N° 56)	ACGGTGTAGCCCTAGTTGTAGA (SEQ ID N° 106)
	CGTTCTTCAAGGNNCTCAGATTGTT (SEQ ID N° 107)
	CTCTGCAATGCATGTTCCCTTT (SEQ ID N° 108)
	CGACCCGGGTGGTGCCGCTCTTGC (SEQ ID N° 109)
	CCATTGCTGTCTNTATCTTGCCC (SEQ ID N° 110)
	GTGTTATCTTN-GCACACGATGC (SEQ ID N° 111)
	GACGGGAGTAGAACTCTGAGGAGA (SEQ ID N° 112)

5 Los resultados muestran que se pudo identificar una única proteína Argonauta de *Giardia* (*Giardia* AGO) que tiene dominios PIWI y PAZ. Su expresión fue evaluada por northern blot y su localización celular fue determinada por la expresión de una versión de la misma fusionada a un tag de haemagglutina. *Giardia* AGO se localiza en el citoplasma.

10 Regulación de la expresión de VSP:

En los experimentos tuvo lugar la presencia de múltiples transcritos homólogos de VSP que conducían la generación de ARN antisentido por *Giardia* RdRP después de la transcripción de varios genes de VSP. Por otra parte, la presencia y actividad de Dicer, y probablemente de AGO, sugiere que un mecanismo como el de ARNi podría estar implicado en la regulación de la expresión de las variantes antigénicas de superficie en *Giardia*.

15 Se analizó si la maquinaria PTGS de *Giardia* podía discriminar la presencia de diferentes ARNm de VSP mediante la mezcla de extractos citoplasmáticos de *Giardia* con uno, dos o tres diferentes transcritos de VSP generados *in vitro*. Cuando dos o más ARNm de VSP radiomarcados se incubaron con extractos de trofozoito que contenían la maquinaria de RNAi, se produjeron pequeños ARN de VSP, con un patrón idéntico al de los productos del ensayo de actividad de Dicer (comparar Fig. 4a y Fig. 4c). Por el contrario, cada vez que un único transcrito fue incubado, la degradación de ARNm no se llevó a cabo. Además, cuando genes no relacionados como *cwp2* (que codifica la proteína 2 de la pared del quiste) o *gdh* (que codifica la glutamato deshidrogenasa) se añadieron a un solo ARNm radiomarcado de VSP, no se detectó la degradación a pequeños ARN (Fig. 4c), lo que indica que el mecanismo de silenciamiento procesa específicamente ARN homólogos. Resultados similares fueron obtenidos al utilizar extractos de células de diferentes clones de *Giardia* (por ejemplo, WBA6, WB1267 o GSH7): el ARN de *vsp9B10* fue procesado a pequeños ARNs sólo cuando se combina con los genes homólogos de otros VSP, pero no cuando era el único ARNm de VSP en la reacción (Fig. 5). Es evidente que la presencia en los extractos de trofozoitos de siRNAs endógeno y varios ARN de VSP tanto sentido como antisentido no interfieren con el proceso de silenciamiento. Debido a que los ARNm de VSP utilizados en estos experimentos fueron sintetizados *in vitro*, es evidente que el mecanismo de silenciamiento puede discriminar entre los ARNm homólogos en ausencia de cualquier posible modificación postranscripcional del ARN. Teniendo en cuenta que se encontraron en *Giardia*

transcriptos sentido y antisentido de VSP y que la actividad Dicer se ha demostrado experimentalmente, se buscaron pequeños ARNs resultantes de la degradación ARNdc de VSP.

5 Usando una sonda de ARN de vsp9B10 parcialmente digerida en ensayos de Northern blot utilizando ARN obtenido de los clones de *Giardia* WB9B10 y WB1267, se pudieron detectar pequeños ARNs de VSPs que no se expresaban (VSP1267 en este caso), pero no se detectaron para VSP9B10, el cual se expresa en la superficie del clon WB9B10 (Fig. 4d). Estos resultados muestran cómo un único transcripto VSP puede superar este proceso de silenciamiento y entonces traducirse y expresarse en la superficie del parásito.

10 Para probar si la concentración de los diferentes transcriptos de VSP tiene un rol en el cambio antigénico, se desbalanceó la expresión de VSP *in vivo* mediante la expresión en un clon tanto vsp9B10 como vspH7 (GenBank número de registro, AAA18202), o construcciones que contengan regiones antisentido de vsp9B10 bajo el control de un promotor tan fuerte como el del gen de la α -tubulina (Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. & Lujan, H. D. J. Biol. Chem. 277, 50557–50563 (2002) y Elmendorf, H. G. y otros, Mol. Biochem. Parasitol. 113, 157–169 (2001)). La VSPH7 mostró expresión variable, incluso bajo la presión de la droga de selección, y VSP9B10 también disminuyó en el tiempo (Fig. 6). Además, cuando VSP9B10 fue noqueado, su expresión en la superficie del parásito disminuyó más rápidamente que en el control (Fig. 7). Estos resultados muestran que la región del promotor de VSPs tiene poca o ninguna influencia en la expresión de VSP y, por tanto, que debe participar un mecanismo PTGS en la regulación de la variación antigénica de *Giardia*.

20 Experimentos adicionales *in vitro* en los que la concentración de las diferentes transcriptos de VSP fue desequilibrada la concentración de ARNm puede ser relevante para un VSP dado, y para eludir los mecanismos de silenciamiento y ser traducido (Fig. 8). Estos resultados sugieren que un extracto de *Giardia* está programado para mantener sin modificar un transcripto de VSP particular, pero puede iniciar la degradación de los ARN que cuando una VSP diferente está en una mayor concentración (el procesamiento de un transcripto dado puede depender de la concentración relativa en el citoplasma de cada uno de los VSPs).

Silenciamiento de RdRP, Dicer y AGO en *Giardia*:

30 Debido a que el silenciamiento de un gen específico no es posibles en *Giardia* a causa de su poliploidía y la presencia de dos núcleos, se realizaron pruebas directas para mostrar la participación de componentes característicos de RNAi en la variación antigénica por noqueo de la expresión Dicer, RdRP y AGO de *Giardia* mediante la expresión constitutiva en trofozoítos de parte de sus transcriptos antisentido. Cuando se llevó a cabo una reducción de la expresión de la RdRP (RdRP-AS) o Dicer (Dicer-AS) (Fig. 9), se generaron trofozoítos que expresan más de un VSP en su superficie, según lo determinado por inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos monoclonales específicos (Fig. 10a y Tabla 2), citometría de flujo (Figura 10b) y Western Blot (Fig. 10c). El silenciamiento de *Giardia* AGO no produjo ningún clon viable, lo que sugiere que esta enzima es esencial para el parásito. Los trofozoítos de la invención en los cuáles Dicer o RdRP fueron noqueados no disminuyen su proliferación y se enquistan normalmente, no se observó efecto nocivo alguno sobre la regulación de VSP cuando se aplicó el procedimiento de silenciamiento o noqueo (Tabla 2). A partir de las enseñanzas que aquí se divulgan es evidente que se puede silenciar o noquear Dicer, RdRP o ambos para obtener un protozoo modificado, por ejemplo un protozoo modificado de Plasmodium, Trypanosoma, o cualquier otro protozoo que presente un mecanismo de variación antigénica.

45 **Tabla 2**
Análisis cuantitativo de la expresión de vsp en *Giardias* con RdRP (RdRP-AS) y Dicer (Dicer-AS) noqueados o silenciados

VSP	Ninguno	Simulado	<i>Giardia</i> RdRP-AS	<i>Giardia</i> Dicer-AS
VSP9B10	99±0.5	98±1.2	90±0.6	18±2.0
VSP1267	0	0.5±0.1	96±0.2	22±0.9
VSPA6	0	0	48±2.3	17±1.3
VSPS1	0	0	62±4.1	36±2.1
VSPS2	0	0	33±1.1	28±3.9
VSPS7	0	0	73±0.3	65±4.4

50 La tabla muestra los porcentaje de trofozoítos de *Giardia* que expresan un VSP particular determinado por ensayos de inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales (Mab) específicos (para VSP9B10 se empleó el Mab 9B10; para VSP1267, 5C1; para VSPA6, 6A7; para VSPS1, 1B2; para VSPS2, 7B8; para VSPS7, 6F8) en trofozoítos de WB9B10 transfectados con constructos antisentidos de genes de *Giardias* que codifican para RdRP y Dicer, como el plásmido vacío solo (simulado) o no transfectados (ninguno) después de 5 días en cultivo. Inmunoglobulinas de cabra anti ratón fueron usadas como control y no mostraron reacción. Los datos se presentan como promedio ± D.S. de 3 experimentos realizados en forma independiente cada uno por duplicado. Los resultados indican, a juzgar por la suma de cada porcentaje, que muchos VSP diferentes pueden ser expresados por un solo trofozoíto.

Tal como se puede observar en la figura 10b los clones mostraron claros patrones de expresión de una sola VSP, mientras que trofozoítos RdRP-AS y Dicer-AS evidenciaron la expresión de más de una VSP por trofozoíto.

5 Tal como se muestra en la figura 10c el anticuerpo monoclonal específico anti-VSP9B10 reconoce sólo una banda en el clon 9B10 y en los trofozoítos de modificados, mientras que el anticuerpo monoclonal 12F1 de la invención reacciona con muchas especies proteicas en los trofozoítos modificados, indicando que muchas VSPs se pueden expresar en forma simultánea en las *Giardia* cuando el camino de ARNi se ha interrumpido o silenciado.

10 En resumen, un sistema de PTGS (que comprende al menos RdRP y Dicer) está implicado en la regulación de la expresión de las proteínas de superficie en *G. lamblia*. Debido a que la respuesta inmune humoral tanto experimental como natural de huéspedes infectados con *Giardia* coincide con la eliminación del VSP original, se ha propuesto un papel funcional de las células y los anticuerpos en la selección de variantes fenotípicas y en el curso de la infección. Dado que la protección del protozoo contra la respuesta inmune específica se basa en la conmutación de la expresión de proteínas de superficie inmunológicamente diferentes, una manera en la que el huésped puede prevenir las infecciones con una respuesta inmunológica específica es mediante la producción de anticuerpos contra todos los determinantes antigénicos de superficie. Estos resultados demostrarían que la regulación disminuida de los componentes de la maquinaria de ARNi conduce a la expresión de más de una proteína de superficie en los trofozoítos o protozoos, constituyendo estos protozoos modificados en una herramienta fundamental para la generación de una vacuna contra importantes patógenos humanos o animales, o contra cualquier microorganismo patógeno que muestre el mecanismo de variabilidad antigénica, por ejemplo Plasmodium o Trypanosoma.

25 Para determinar si los trofozoítos de *Giardia* modificados que expresan todo el repertorio de VSPs podían utilizarse como vacunas se realizaron estudios en un modelo experimental de Giardiasis en jерbo. Primero se generaron trofozoítos de aislamientos de WB que expresan el repertorio completo de VSPs noqueando la expresión de *Giardia* Dicer (DAS) o *Giardia* RdRP (RAS) tal como se muestra en los ejemplos. Además, se obtuvieron poblaciones de trofozoítos que expresaban solamente una de las VSP en su superficie mediante dilución limitante en aislamientos de células de WB y GS controlados mediante el uso de Mab contra determinadas VSPs. La figura 11 muestra que los trofozoítos en el que Dicer (Fig. 11a) o RdRP (Fig. 11b) han sido silenciados expresan en su superficie muchas VSPs, por ejemplo tal como se visualizan en los ensayos de inmunofluorescencia directa que muestran co-localización (amarillo) de VSP9B10 (verde) y VSP1267 (rojo). Tal como se puede observar la mayoría de los trofozoítos expresan más de una VSP en su superficie. El porcentaje de células que expresan diferentes VSPs en su superficie se determinó mediante el uso de un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes VSP (Tabla 3)

35

Tabla 3

Mab	WB9B10	DAS	RAS	DAS + RAS
Control	0	0	0	0
9B10	99	78	67	75
5C1	0	96	51	93
6E7	0.1	89	93	84
G10/4	0	0	0	0
9C9	0	0	0	0
1B2	0	66	92	91
7B8	0	89	74	84
6F8	0	87	46	71
7G8	0	90	89	88
1B4	0	77	52	68

40 Estos porcentajes demuestran que las células expresan simultáneamente una gran cantidad de VSPs en su superficie (> 100%). Estos trofozoítos modificados crecen y se enquistan *in vitro* como células de tipo salvaje, lo que indica que el silenciamiento de estas enzimas no interfiere con otros procesos celulares. En cultivo, los trofozoítos cambian espontáneamente una VSP a otra, y por esa razón, las poblaciones de células que expresan una VSP específica en su superficie se mantendrán exclusivamente en cultivo durante 24 hs luego de la clonación y la selección de manera que se asegure la homogeneidad de las poblaciones. La Fig. 11c muestra que todos los trofozoítos de un cultivo sin clonar de aislados de WB pueden ser marcados (tras la permeabilización) con el anticuerpo monoclonal de la invención que es específico para la cola citoplasmática CRKGA común a todas las VSPs conocidas. Poblaciones clonales de trofozoítos que expresan sólo una VSP (VSP9B10, VSP1267, VSPA6), según lo determinado por los ensayos de Inmunofluorescencia indirecta contrastados con DAPI, se pueden observar en la figura 1d-f (Mab 9B10, Mab 5C1, Mab 6E7, respectivamente). Estas poblaciones de *Giardia* fueron utilizadas inicialmente para infectar a los jerbos SPF. La infección se inició mediante la inoculación orogástrica de los

45

trofozoítos y la liberación de quistes, que indican claramente la infección de los animales. Se evaluaron e identificaron los quistes de *Giardia* en muestras de heces mediante ensayos de inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal específico para CWP2 (Mab 7D2). Además, se contó la cantidad de quistes por gramo de heces generadas por estos animales en función de determinar la infectividad y la virulencia de cada población de células de tipo modificado y silvestre. La Fig. 12a muestra que todas las poblaciones fueron capaces de establecer la infección en los jerbos sanos. El comienzo de la aparición de quistes en muestras de heces y la cantidad de quistes varió ligeramente entre los diferentes trofozoítos utilizados. Algunos animales fueron sacrificados y el contenido intestinal recogido para verificar la presencia de trofozoítos en el intestino delgado. Los animales infectados presentaron durante la segunda semana de infección algunos episodios de diarrea y algunos de ellos perdieron peso. A fin de evitar la posibilidad de que algunos animales pudieran estar infectados de forma crónica con una pequeña cantidad de trofozoítos, la mitad de los animales fueron tratados con metronidazol para curar completamente cualquier posible infección indetectable.

Para determinar si la infección primaria con trofozoítos que expresaban una VSP particular (VSP9B10 y VSP1267) o con trofozoítos que expresaban el repertorio completo de VSPs (DAS, RAS, DAS + RAS) protegía a los animales de infecciones posteriores, los mismos animales fueron inoculados con una población clonal de los trofozoítos que expresaban una VSP específica (VSP9B10 o VSP1267) 2 meses después de la auto-curación de la infección primaria. Las Fig. 12b y 12c muestran los resultados de la eliminación de los quistes de los animales previamente infectados con WB9B10 o WB1267, respectivamente. Las Fig. 12d y 12e muestran los resultados de los animales previamente infectados con trofozoítos DAS o RAS, respectivamente. Los resultados indican claramente que (a) los animales infectados con trofozoítos que expresaban una única VSP eran refractarios a una segunda infección con células que expresaban la misma VSP, lo que sugiere el desarrollo de una fuerte respuesta inmune durante la infección original contra una determinada proteína de superficie (Fig. 12a y 12b), (b) los animales infectados con células que expresaban una VSP particular, eran fácilmente re-infectados con trofozoítos que expresaban un VSP diferente, lo que sugiere que, de forma similar a lo observado en las infecciones humanas, las re-infecciones son comunes después de la cura o el tratamiento con medicamentos (Fig. 12b y 12c). (c) Por el contrario, los animales que fueron infectados con poblaciones de trofozoítos que expresaban todo el repertorio de VSPs estaban protegidos frente a infecciones posteriores con poblaciones clonales que expresaban sólo una VSP en su superficie (Fig. 12d y 12e). Los mismos desafíos experimentales se realizaron a los 2, 4, 6 y 12 meses de la infección original y los resultados fueron idénticos (Tablas 4 y 5).

Tabla 4: Desafío con trofozoítos del clon WB9B10 y porcentaje de jerbos infectados (entre paréntesis).

Infección primaria con	Cantidad de jerbos	MNZ	Desafío al mes 2 (% de infección)	Desafío al mes 4 (% de infección)	Desafío al mes 12 (% de infección)
Ninguno	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
Ninguno	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Si	30- (0%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	29- 1+ (3.3%)	N/A	N/A
WB1267	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Si	27- 3+ (10%)	30- (0%)	30- (0%)
Dicer-AS	90	No	29- 1k (0%)	28- 2k (0%)	27- 3k (0%)
RdRP-AS	90	Si	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)	29- 1k (0%)
RdRP-AS	90	No	28- 2+ (6.6%)	28- 2k (0%)	29- 1k (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Si	28- 1+ 1k (3.3%)	30- (0%)	29- 1+ (3.3%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	No	29- 1k (0%)	29- 1+ (3.3%)	30- (0%)

Tabla 5: Desafío con trofozoítos del clon WB1267 y porcentaje de jerbos infectados (entre paréntesis).

Infección primaria con	Cantidad de jerbos	MNZ	Desafío al mes 2 (% de infección)	Desafío al mes 4 (% de infección)	Desafío al mes 12 (% de infección)
Ninguno	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
Ninguno	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Si	30- (0%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	29- 1+ (3.3%)	N/A	N/A
WBA6	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Si	28- 2+ (6.6%)	28- 1+ 1k (3.3%)	30- (0%)
Dicer-AS	90	No	29- 1+ (3.3%)	29- 1d (0%)	29- 1k (0%)

RdRP-AS	90	Si	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)
RdRP-AS	90	No	28- 1+ 1k (3.3%)	28- 2k (0%)	30- (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Si	28- 2+ (6.6%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	No	30- (0%)	30- (0%)	30- (0%)

- Los ensayos de inmunofluorescencia realizados en las heces de los animales seleccionados usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra *Giardia* CWP2 muestran claramente la liberación de quistes en los animales infectados y la ausencia de ellos en los protegidos (Fig. 13). Tal como se puede observar los animales previamente infectados con el clon WB9B10 fueron refractarios a la infección subsecuente con el mismo clon (no se observaron quistes en las heces) pero se infectaron con trofozoítos que expresan VSP1267 (se detectó una elevada cantidad de quistes). Los jerbos previamente infectados con trofozoítos DAS o RAS fueron protegidos frente a infecciones subsecuentes con clones WB9B10 o WB1267 (no se encontraron quistes en las muestras de heces).
- Para determinar si los quistes obtenidos en las infecciones originales (para los cuales la VSP de los trofozoítos liberados era desconocida) podía infectar a estos animales, los jerbos previamente infectados con poblaciones DAS, RAS, y DAS + RAS fueron inoculados con un gran número de quistes. Los resultados de la Tabla 6 muestran que, al igual que los animales inoculados con poblaciones de trofozoítos particulares, los animales fueron refractarios a la infección en comparación con los jerbos control. En conjunto, estos resultados muestran firmemente que es necesaria una respuesta inmune a todas las VSPs para evitar la generación de nuevas infecciones.

Tabla 6: Desafío de la infección con quistes y porcentaje de jerbos infectados (entre paréntesis)

Infección primaria con	Cantidad de jerbos	MNZ	Desafío al mes 2 (% de infección)	Desafío al mes 4 (% de infección)	Desafío al mes 12 (% de infección)
Ninguno	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
Ninguno	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	29+ 1k (96.6%)	N/A	N/A
WBA6	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Si	30- (0%)	30- (0%)	30- (0%)
Dicer-AS	90	No	29- 1k (0%)	30- (0%)	29- 1k (0%)
RdRP-AS	90	Si	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)	29- 1k (0%)
RdRP-AS	90	No	29- 1+ (3.3%)	28- 1+ 1k (3.3%)	29- 1k (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Si	29- 1+ (3.3%)	30- (0%)	30- (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	No	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)

- Además, los síntomas observados durante la infección primaria desaparecieron durante la infección del desafío. Estos resultados indican nuevamente que es necesaria una respuesta inmune contra todas las VSPs para evitar nuevas infecciones.

- Por otra parte, se obtuvo suero y contenido intestinal de los animales infectados y de los animales control, y se los enfrentó *in vitro* con trofozoítos que expresaban una o varias VSPs. El suero o el contenido intestinal de los animales no infectados no tuvieron efecto sobre la morfología, la viabilidad, o la motilidad del parásito (Fig. 14). A la inversa, cuando una población clonal de trofozoítos que expresan una única VSP fue incubada con el Mab dirigido contra esta proteína o con suero o contenido intestinal de los animales infectados con dicho clon, ocurrió el desprendimiento y la aglutinación de toda la población, indicando que los anticuerpos contra la proteína de superficie estaban presentes. La incubación con el suero o el contenido intestinal de los jerbos infectados con un clon diferente no mostró efecto significativo alguno (Fig. 14). Cuando una población clonal se enfrentó con el suero o el contenido intestinal de los jerbos infectados con células en las que Dicer o RdRP han sido silenciados, se produjo una fuerte aglutinación de los trofozoítos (Fig. 14). Estos resultados indican que los jerbos infectados fueron capaces de desarrollar una fuerte respuesta inmune a la VSPs presentes en los trofozoítos, y que otros antígenos que pueden estar presentes en la superficie de las células son irrelevantes, no sólo en la producción de anticuerpos sino también para conferir protección contra infecciones posteriores.

- Además, se ensayaron los fluidos contra trofozoítos de aislados GS/M (ensamblado B). En este caso, el suero y el contenido intestinal de los animales infectados con trofozoítos DAS y RAS mostraron aglutinación parcial de las células (entre 30 y el 40%), indicando que estos ensamblajes pueden compartir algunos epítopes comunes en sus VSPs.

Por otra parte, se produjeron líneas de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales contra la cola citoplasmática de los VSPs que tiene la secuencia de aminoácidos CRKGA.

Inmunización de los jerbos con VSP purificados

5 Se purificó el repertorio completo de VSPs a partir de trofozoítos modificados DAS y RAS (ver ejemplos) utilizando el anticuerpo monoclonal que reaccionan con la cola citoplasmática de 5 amino ácidos presente en todos los VSPs Como control se sobre expresó e inmunopurificó un antígeno intracelular de *Giardia*, GRP78/BiP. Los animales fueron luego inmunizados con estas preparaciones proteicas, sin adyuvante, mediante administración orogástrica en tres dosis durante 3 días. En todos los casos la vacunación no dio origen a síntomas de enfermedad, indicando que los VSPs solos no son tóxicos para los animales. Luego de 2 meses, los animales fueron inoculados con parásitos que expresan VSPs particulares. La infección de los animales fue monitoreada contando los quistes en las heces y en algunos casos sacrificando los animales para observar la presencia de trofozoítos en el intestino delgado. La inmunización oral con el repertorio completo de VSPs genera una fuerte respuesta inmune que previene la infección de los animales; resultados similares se observaron durante las infecciones primarias. Por otra parte, los animales control inoculados con un vehículo o con GPR78/BiP se infectaron rápidamente con poblaciones clonales de trofozoítos (Fig. 15). Los VSPs individuales purificados utilizados como inmunógenos mostraron resultados idénticos a los observados en los experimentos de infección descritos más arriba. La protección generada por la preparación del todo el repertorio de VSPs se mantuvo durante al menos un año (Tablas 7, 8 y 9).

Tabla 7: Desafío con trofozoítos del clon WB9B10 y porcentaje de jerbos infectados (entre paréntesis) luego de la inmunización con VSPs purificadas.

Inmunización con VSPs o Bip	Cantidad de jerbos	MNZ	Desafío al mes 2 (% de infección)	Desafío al mes 4 (% de infección)	Desafío al mes 12 (% de infección)
Ninguno	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
Ninguno	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Si	30- (0%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	28- 2+ (6.6%)	N/A	N/A
WB1267	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Si	25- 5+ (16.6%)	27- 3+ (10%)	28- 1+ 1k (3.3%)
Dicer-AS	90	No	26- 3+ 1k (10%)	25- 1+ 4k (3.3%)	27- 3+ (10%)
RdRP-AS	90	Si	28- 2+ (6.6%)	28- 1+ 1d (3.4%)	28- 1+ 1k (3.3%)
RdRP-AS	90	No	26- 2+ 2k (6.6%)	27- 2+ 1k (6.6%)	30- (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Si	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)	30- (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	No	29- 1k (0%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)
BiP	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
BiP	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A

Tabla 8: Desafío con trofozoítos del clon WB1267 y porcentaje de jerbos infectados (entre paréntesis) luego de la inmunización con VSPs purificadas.

Inmunización con VSPs o Bip	Cantidad de jerbos	MNZ	Desafío al mes 2 (% de infección)	Desafío al mes 4 (% de infección)	Desafío al mes 12 (% de infección)
Ninguno	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
Ninguno	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Si	30- (0%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	29- 1+ (3.3%)	N/A	N/A
WBA6	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Si	29- 1+ (3.3%)	27- 2+ 1k (6.6%)	29- 1+ (3.3%)
Dicer-AS	90	No	27- 3+ (10%)	24- 2+ 4k (10%)	29- 1+ (3.3%)
RdRP-AS	90	Si	28- 2+ (6.6%)	29- 1+ (3.3%)	28- 2k (0%)
RdRP-AS	90	No	26- 3+ 1k (10%)	29- 1+ (3.3%)	30- (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Si	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (3.3%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	No	29- 1k (0%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)

BiP	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
BiP	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A

Tabla 9: Desafío de la infección con quistes y porcentaje de jerbos infectados (entre paréntesis)

Inmunización con VSPs o Bip	Cantidad de jerbos	MNZ	Desafío al mes 2 (% de infección)	Desafío al mes 4 (% de infección)	Desafío al mes 12 (% de infección)
Ninguno	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
Ninguno	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Si	29+ 1- (96.6%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Si	27- 3+ (10%)	27- 3+ (10%)	28- 2+ (6.6%)
Dicer-AS	90	No	25- 3+2k (10%)	23- 2+ 5k (10%)	30- (0%)
RdRP-AS	90	Si	30- (0%)	28- 1+ 1k (3.3%)	29- 1+ (3.3%)
RdRP-AS	90	No	28- 2+ (6.6%)	27- 1+ 2k (6.6%)	29- 1+ (3.3%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Si	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	No	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)	29- 1k (0%)
BiP	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
BiP	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A

5 Es interesante señalar que aunque la infección con *Giardia* muestra a veces ausencia de inflamación, el intestino de los jerbos infectados mostraba un aumento en el tamaño de las placas de Peyer y en los neutrófilos, mastocitos, y linfocitos infiltrantes del epitelio intestinal (Fig. 16). Las alteraciones macro y microscópicas del intestino delgado superior no se hicieron evidentes en los jerbos inmunizados (Fig. 16).

10 Estos resultados indican que tanto la infección inicial como la inmunización con los preparados de VSPs son capaces de conferir a los animales una protección inmune capaz de prevenir la infección posterior con quistes de *Giardia* o clones obtenidos de las muestras de heces de personas infectadas.

15 En todos los casos N/A significa no aplicable, d significa animales sacrificados para la detección de parásitos en el intestino.

Los protozoos modificados *Giardia* y las vacunas de la invención incrementan la inmunidad de cualquier mamífero contra infecciones producidas por protozoos que muestran mecanismos de variación antigénica para superar la respuesta inmune del huésped.

20 Tanto los protozoos de tipo salvaje como los modificados o silenciados generaron una infección con un pico de excreción de quistes en el día 15 y se autorresolvió el día 30.

Los animales tratados o no con metronidazol mostraron un patrón de protección similar a las subsiguientes infecciones.

25 Los quistes generados por ambos tipos de trofozoítos, silvestres y modificados (silenciados) son infecciosos para los jerbos nativos.

30 Los jerbos infectados con *Giardia* vivas que expresan solamente una de las VSPs en su superficie están protegidos contra las infecciones posteriores del mismo clon.

Los jerbos infectados con *Giardia* vivas que expresan solamente una de las VSPs en su superficie no están protegidos contra infecciones posteriores de clones diferentes.

35 Los jerbos infectados con trofozoítos de *Giardia* vivas que expresan todo el repertorio de VSPs, por ejemplo por silenciamiento de Dicer y/oRdRP, están protegidos contra una posterior infección con diferentes poblaciones clonales.

40 Los jerbos infectados con trofozoítos de *Giardia* vivos que expresan todo el repertorio de VSPs, por ejemplo por silenciamiento de Dicer y/oRdRP, están protegidos contra una posterior infección con quistes obtenidos a partir de muestras de materia fecal humanas.

Los jerbos inmunizados con trofozoítos de *Giardia* muertos que expresan todo el repertorio de VSPs, por ejemplo por silenciamiento de Dicer y/o RdRP, están protegidos contra una posterior infección de las diferentes poblaciones clonales.

- 5 Los jerbos inmunizados con VSPs purificadas están protegidos contra una infección posterior de las diferentes poblaciones clonales.

Los jerbos inmunizados con un antígeno intracelular purificado no están protegidos contra una infección posterior.

- 10 La infección primaria con células que expresan todo el repertorio de VSP genera una respuesta inmunológica que protege a los animales de infecciones posteriores (protección entre el 87 y el 100%).

Ninguna formulación de la vacuna ha demostrado efectos tóxicos sobre los animales.

- 15 Esta invención se encuentra mejor ilustrada según los siguientes ejemplos, los cuales no deben ser interpretados como una limitación impuesta al alcance de la misma.

Ejemplos

- 20 Ejemplo 1: Cultivo y clonado del parásito: Se cultivaron trofozoítos de *Giardia* en medio TYI-33 suplementado con suero bovino adulto y bilis bovina (Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., Bowers, B. & Nash, T. E. J. Biol. Chem. 270, 29307–29313 (1995). La clonación continua de los trofozoítos se llevó a cabo mediante dilución limitante y la selección se basó en ensayos de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal anti VSP correspondiente. La enquistación se realizó según un reporte previo (Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., Bowers, B. & Nash, T. E. I, J. Biol. Chem. 270, 29307–29313 (1995). Se utilizaron trofozoítos de *Giardia lamblia*, cepa WB clones 9B10, 1267 y A6, y cepa GS clon H7.

PCR: El ADN total de trofozoítos de *G. lamblia* fue aislado como se describe en (Mowatt, M. R. L., H. D.; Cotten, D. B.; Bowers, B.; Yee, J.; Nash, T. E.; Stibbs, H. H. *Mol Microbiol* 15, 955-63 (1995).

- 30 a: cebadores sentido S1 (5'-CVT GTG CHR RST GCA A-3') (SEQ ID N° 113), S2 (5'-TGC ACS RSC TGC YAB CC-3') (SEQ ID N° 114), S3 (5'-TAG TGY DSY VMV TGY AA-3') (SEQ ID N° 115) y S4 (5'-CGA TCA TGA CGG GCT TCT-3') (SEQ ID N° 116). Cebadores antisentido R1 (5'-CCB ACG AGG CCY CCS ACG AC-3') (SEQ ID N° 117) y R2 (5'-CGC CTT CCC KCK RCA KAY GA-3') (SEQ ID N° 118). Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 94°C durante 40 s, hibridación a 53°C durante 40 s y elongación a 72°C durante 90 s, utilizando Taq polimerasa High Fidelity (Invitrogen) para un total de 35 ciclos.

- RT-PCR. Cebadores VSP Sentido (S1-S4) se añadieron a 1 µg de ARN total y se calienta a 70°C durante 5 min. Las muestras (2 microlitros) de la reacción de transcripción inversa se amplificaron utilizando todas las combinaciones posibles de cebadores entre sentido / anti- sentido listadas más arriba o utilizando cebadores específicos vsp1267 y vsp9B10 (1267_F, 5'-ATG TTG TTG ATA GCC TTC TAT C-3') (SEQ ID N° 119); 1267_R, 5'-CTA CGC CTT CCC CCT GCA TAT G-3' (SEQ ID N° 120); 9B10_F, 5'- ATG TTT GGC AGT TTT GTT CTC-3' (SEQ ID N° 121); 9B10_R, 5'-TCA CGC CTT CCC TCT ACA TAT G-3' (SEQ ID N° 122)). Los productos RT-PCR fueron analizados por electroforesis y purificados mediante el Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen). Para estudiar la expresión de los diferentes genes durante la diferenciación de trofozoítos de *Giardia* o en los experimentos de silenciamiento se usó RT-PCR con los siguientes pares de cebadores específicos: gDicer (645 bp): HL160, 5'-TGG CGG CGT CGT ATC AGT TAT -3' (SEQ ID N° 123), HL161, 5'-TCC CCG CAC GCA AGA AGA A-3' (SEQ ID N° 124); gAgo (912 bp): HL164, 5'-ATT GCC CCC TAC GGT GTC-3' (SEQ ID N° 125), HL165, 5'-CTC TGC CGG CCT TCC TAC-3' (SEQ ID N° 126), gRdRP (569 bp): HL187, 5'-CAT GGG TTG CAG TTT CTT GAC GA-3' (SEQ ID N° 127), HL188, 5'-AGC CCC TTA TCT GTT GCC TCC TTC-3' (SEQ ID N° 128); y el control de la expresión diferencial de CWP1 (533 bp): HL183, 5'-TCG CCC TGG ATG TTT CGG ACA T-3' (SEQ ID N° 129), HL184, 5'-AGG CGG GTG AGG CAG TA-3' (SEQ ID N° 130), y la expresión constitutiva de GDH (407 pb): HL185, 5'-AGT GGG GCG GGT CTT TAC TCA-3 (SEQ ID N° 131) ', HL186, 5'-TGT TCG CGC CCA TCT GGT AGT TCT -3' (SEQ ID N° 132). Los productos de estas reacciones también fueron aislados, marcados, y utilizados como sondas para Northern blot, tal como se indica a continuación.

- Hibridación Northern: El ARN total (10-15 µg) se fraccionó en un gel de agarosa-formaldehído al 1,2%, añadieron a un Hybond N+ (GE) y fijado con un Crosslinker UV (UVP) por los procedimientos estándar. El fragmento conservado C-terminal (anti-sentido cebador R2) fue marcado radiactivamente con el polinucleótido quinasa T4 utilizando γ-[32P]-ATP (5'-End Labelling System Promega). grdrp, así como otros fragmentos de ADN, fueron uniformemente marcados por el "cebado aleatorio (Prime-A-Gene sistema de etiquetado Promega).

- 65 *Análisis nucleares run-on*: Se resuspendieron 10⁷-10⁸ células en 1 ml de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 1,5 mM de MgCl₂, 0,14 M NaCl, y Complete TM cóctel inhibidor de la proteasa) en baño de hielo a 4°C; 2,25µl de Nonidet P-40 se han añadido y la suspensión se incubó durante 15 minutos en hielo. Los núcleos fueron

recuperados por centrifugación a 2.000 g durante 1 min y se lavaron dos veces en 1 ml de buffer de lavado nuclear frío (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 140 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20% (V / V) glicerol y 14mM mercaptoetanol) a 4°C. Luego, los núcleos se resuspendieron en 50 µl de buffer de marcación (20 mM Tris-HCl (pH 8,4 a 4°C), 140 mM KCl, 10 mM de MgCl₂, 20% (V / V) de glicerol y 14 mM mercaptoetanol, 1 mM de cada uno de ATP, GTP y CTP, 10 mM fosfocreatina, 100 µg / ml y fosfocreatina quinasa 0,1 µM [32P] UTP, 5000 µCi / ml) y se incubó 2 durante 40 min a 37°C. Los productos de VSP fueron generados por RT-PCR y 3 µg de vsp9B10, vsp1267, vspH7, y vspA6 clonado en el p-GEM T-easy vector (Promega) fueron transferidos a Hybond N + utilizando un aparato spot blot (BioRad). Además, los transcritos sentido y antisentido generados en la reacción de transcripción in vitro también se blotearon en condiciones similares

Detección de ARN pequeños: La detección de ARN pequeños fue realizada como se reportó anteriormente (35. Hutvagner, G., Mlynarova, L. & Nap, J. P. Detailed, RNA 6, 1445–1454 (2000). Brevemente, 15 µg de ARN total de *G. lamblia* fue desnaturalizado por 10 min a 65 °C en buffer de siembra 1X, y cargadas en un gel 15% de poliacrilamida / 7 M urea. Después de la separación electroforética, el ARN fue electrobloteado en buffer 0.5X Trisborate-EDTA (pH 8) a una membrana Hybond N+ durante 45 min a 100 V en TBE 0.5X, y, finalmente fijado con UV. Ribosondas marcadas con [32P] fueron transcriptas in vitro por T7 o SP6 ARN polimerasa usando los genes VSPs 9B10, 1267 y H7 clonados en el p-GEM T-easy vector (Promega). ARN marcado fue parcialmente hidrolizado durante 1 hora por incubación a 60 °C en presencia de 80 mM NaHCO₃ y 160 mM Na₂CO₃. Cada transcripto hidrolizado de VSP se hibridizó en 25% formamida, 0,5 NaCl, 25 mM EDTA, 1X Solución de Denhardt y 150 µg / ml de ADN desnaturalizado de esperma de salmón y se incubó a 42 °C durante la noche. Después de la hibridación las membranas se lavaron dos veces en 2X SSC, 0,5% SDS durante 30 min y una vez en 0.5X SSC, 0,5% SDS durante 15 min a 45 °C. Posteriormente, cada uno de los VSP hidrolizados de transcripción inversa se hibridaron de la misma manera y las señales de las membranas fueron detectadas por exposición a Películas Kodak XAR al -70 °C o un phosphoimager (Amersham). Estándares de longitud provinieron de una fuente comercial (Decade™ marcadores de ARN, Ambion).

Actividad de endonucleasa: Actividad Dicer fue analizada por incubación de las moléculas de ARN bicatenario con extractos citoplasmáticos de *Giardia* WB9B10 clon, WBA6, o WB1267. vsp9B10, vsp1267, vspH7, cwp2, GDH genes clonados en p-GEM-T easy vector (Promega) fueron transcritos in vitro para producir sondas de ARN sentido de longitud completa marcados con [32P], que se han purificado y probado para la ausencia de pequeños ARN contaminantes. Transcritos de VSP puros o mezclados se incubaron durante 1 hora a 37°C con extractos de *Giardia*. Los dsRNA fueron producidos por annealing in vitro de las mismas cantidades de transcritos de ARN sentido y antisentido (vsp1267, vsp9B10, cwp2 y GDH), marcados o no con [32P] UTP. Estos ARNdc fueron resuspendido en Tris-HCl (pH 7,5) / 20mM NaCl, calentados a 95 °C 1 min y enfriados a temperatura ambiente durante 12 h. Los lisados celulares se generaron a partir de 10⁷-10⁸ células, que se resuspendieron en 500 µl de buffer (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM de Sacarosa, y que contiene un Coctel de Inhibidores de proteasas. Complete™), se sonicaron, y se centrifugaron a 2.000 g durante 15 min para separar las células sin romper y los núcleos y, a continuación se incubaron con ARNdc a 37 ° C durante 1 h. A continuación, se extrajo el ARN total, y se transfirió como se ha indicado anteriormente para los pequeños ARN. La selección de los ARN de bajo peso molecular fue realizada por filtración a través de unidades de filtración Microcon-100. El filtrado, que contiene pequeños RNAs, se precipitó con 300 mM NaCl/0.6 ml de isopropanol, cargadas en un gel de poliacrilamida al 20% / 7 M urea, empleado como soporte de la electroforesis. Para determinar los efectos de la ATP en la actividad endonucleasa, el ATP fue agotado por incubación con extractos citoplasmáticos de *Giardia* con 2 mM glucosa/0.1 U / µl hexoquinasa (Sigma) durante 30 min a 35 °C. Luego, dsRNA [32P] UTPmarcado de vsp1267 fue agregado en el lisado en presencia o ausencia de 10 mM fosfocreatina, 100 µg / ml fosfocreatina quinasa, o ambas, por 1 ó 3 horas a 37°C. El ARN total fue extraído usando Trizol y la muestra de ARN se enriquecieron en ARN de bajo peso molecular mediante la unidad de filtración Microcon-100 como se describe arriba. Las muestras fueron sometidas a electroforesis y los productos fueron detectados como se describe arriba. Los productos de procesamiento de ARNdc utilizando extractos de *Giardia* se purificaron por gel, ligados, amplificados, clonados, y secuenciados (Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K. & Ullu, E. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95, 14687–14692 (1998).

Para determinar la naturaleza de los pequeños ARNs, estos fueron tratados con fosfatasa alcalina (para demostrar la presencia de 5' fosfatos) o sometido a oxidación con periodato seguida de β-eliminación (para confirmar la presencia de 3' hidroxilos), como describe (Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. *Genes Dev* 15, 188-200 (2001).

RdRP clonación, secuenciación, y actividad: Por RT-PCR, la síntesis de ADNc se realizó mediante el ARN total extraído de trofozoítos y oligo (dT) 20 como cebadores. el alineamiento de RdRPs de varios organismos, en relación con el uso de codones conocidos en *Giardia*, permitió el diseño de cebadores moderadamente degenerados: RdRP_F: (5'-TA (T / C), GT (T / C) TTT AC (T / C) GAT GGC G (C / G) A GG) -3') SEQ ID N° 133 y SEQ ID N° 134; y RdRP_R: (5'-TCA CC (A / G) TCC AGG TC (G / A) CTG CC) -3') SEQ ID N° 135 y SEQ ID N° 136. El producto de PCR generado con los oligonucleótidos se sometió a electroforesis, purificado por gel, marcado radiactivamente por el cebado al azar, y utilizado para una comparar con una biblioteca de DNA de *G. lamblia* en lgt22a como se reporto en (Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. *Genes Dev* 15, 188-200 (2001). La revisión de la biblioteca λZAP gDNA se realizó como describe (Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. *Genes Dev* 15, 188-200 (2001). Los

fragmentos de ADN fueron clonados en pBluescript SKII+ y secuenciados automáticamente. 3' 5'-RACE se realizó utilizando un kit comercial de Invitrogen y los cebadores 5'-CTT GTG CAT AGT AAA CAA AG-3' SEQ ID N° 137 y 5'-CAA ATG GTC GAT GCT GGG-3' SEQ ID N° 138. Para la actividad de gRdRP in vitro, RdRP marcada conHA se purificó de trofozoítos transfectados por afinidad utilizando antiHA-sefariosa (Sigma). La actividad enzimática fue ensayada a 35 ° C durante 60 min en 20 µl de la mezcla de reacción que contiene 50 mM Hepes pH 7,6, 20 mM de acetato de amonio, 5 mM de MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 1 mM de cada uno de los cuatro ribonucleósidos trifosfato (incluyendo [α -³²P] UTP), y 1 U / µl RNasin, más la adición de sustratos ssARNcs (250 µg / ml), preparado por transcripción in vitro como se describe, con o sin la presencia de cebadores específicos de VSP. Productos de reacción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa seguido de la transferencia y la autorradiografía.

Transfección y ensayos de inmunofluorescencia: El plásmido pTubPac37 fue modificado para introducir el gRdRP entero, gDicer, gAgo, y las regiones codificantes de VSPH7 y, cuando correspondió, el epítipo de la hemaglutinina de la Influenza (HA) antes del codón de parada TAA (Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. & Lujan, H. D. J. Biol. Chem. 277, 50557–50563 (2002)). La región codificante de gAgo se introdujo en el plásmido pTubNterPac en la que el gen se introdujo después de la región de codificación de la hemaglutinina para evitar la posible interferencia de la etiqueta HA con el dominio PIWI. Este plásmido es una modificación de pTubNterPac con la sustitución del sitio múltiple original de clonación por una nueva (MCSnewSense: 5' GAT TCC GGG CCC AGATCT ATC GAT ACG CGT ATG CAT TCG CGA GAT ATC TGC 3' SEQ ID N° 139; MCSnewAntisense: 5' GCG GCC GCA GAT ATC TCG CGA ATG CAT ACG CGTATC GAT AGA TCT GGG CCC G 3' SEQ ID N° 140). La transfección de trofozoítos de *G. lamblia* fue realizada por electroporación como ya se ha descrito (Yee, J. & Nash, T. E. Proc. Natl Acad. Sci. USA 92, 5615–5619 (1995)). Las células fueron incubadas en hielo por 10 minutos, cultivadas en medio de crecimiento durante la noche a 37°C y seleccionados como células resistentes a puromicina. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA (Sigma) se realizó en trofozoítos no enquistados quince días después de la transfección como se describe en (Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. & Lujan, H. D. J. Biol. Chem. 277, 50557–50563 (2002)). Se informó anteriormente que anticuerpos monoclonales anti-VSP se utilizaron para probar la expresión de VSP diferentes en trofozoítos fijados como se describe en (Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. & Lujan, H. D. J. Biol. Chem. 277, 50557–50563 (2002)). Nuevos anticuerpos monoclonales generados en este estudio se utilizaron de manera similar. Imágenes confocales se recopilaban mediante un microscopio Pascal LSM5 Zeiss Laserscanning equipado con un láser de argón/helio/neón, y un objetivo de inmersión en aceite X100 (apertura numérica = 1,4) (Zeiss Plan Apochromat). Secciones confocales simples de 0,3 micras fueron tomadas en paralelo a los cubreobjetos (z secciones). Las imágenes fueron obtenidas usando una cámara Zeiss acoplada al dispositivo y procesada con el LSM y Software Photoshop de Adobe. Para el análisis funcional de gRdRP, gDicer, y gAgo, y VSP9B10 cebadores sentido específico que contiene un sitio Eco RV y cebadores antisentido con un sitio Nco I se utilizaron para amplificación mediante PCR de una parte de la ORF de cada gen. Productos de PCR fueron purificados, restringidos, y clonados en el vector pTubHAPac. Así, los genes fueron inversamente insertados dentro de pTubHAPac, dando la construcción antisentido que se utilizó para la inhibición de la expresión (Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. & Lujan, H. D. J. Biol. Chem. 277, 50557–50563 (2002)). Las secuencias fueron siempre confirmadas por secuenciación. El silenciamiento de los genes fue confirmado por RT-PCR y qRT-PCR utilizando cebadores específicos para el gen indicados anteriormente sobre el ARN total extraído de trofozoítos transfectados comparados con las células control transfectadas con el vector solamente o con el mismo vector que expresa una señal HA de cada molécula.

Ejemplo 2:

Producción de anticuerpos monoclonales contra la cola de 5 aminoácidos de VSPs y VSPs individuales: Ratones BALB/c hembras de 6 semanas fueron inmunizados por vía subcutánea con 200 mg de (a) una preparación purificada por HPLC del péptido NH₂-CRGKA-COOH conjugado a KLH utilizando sMBS como cross-linker, o (b) múltiples péptido antigénicos sintéticos [NH₂-CRGKA] 8 - [K] 7-Bala-OH (obtenidos de Biosíntesis, Inc.), o el extracto de proteínas del cultivo de trofozoítos derivados del aislado de WB, emulsionados en sistema adyuvante (Sigma). Los ratones fueron estimulados por vía subcutánea después de 21 días con 200 mg de la misma preparación, y 20 días después reestimulados por vía intravenosa con 100 mg de la preparación del antígeno. Tres días después, los ratones fueron sacrificados y las células del bazo fueron utilizadas para la fusión con células de mieloma NSO. Los hibridomas secretores de anticuerpos fueron examinados por ELISA con los péptidos originales y por inmunofluorescencia indirecta utilizando trofozoítos no enquistados y enquistados (Jambhekar, A. D. y otros, RNA 13, 625–642 (2007) y Aggarwal, A., Merritt, J. W., Jr. & Nash, T. E. Cysteinerich; *Mol Biochem Parasitol* 32, 39-47 (1989)). Los anticuerpos monoclonales contra VSP se generaron utilizando trofozoítos enteros como se reportó antes (Mowatt, M. R. L., H. D.; Cotten, D. B.; Bowers, B.; Yee, J.; Nash, T. E.; Stibbs, H. H. *Mol Microbiol* 15, 955-63 (1995)).

Metilación del ADN: ADN del clon 1267 de *G. lamblia* fue purificado por extracción con fenol, y cloroformo/alcohol isoamílico (24/1% v/v), incubados con ARNasa (Roche) para eliminar la contaminación con ARN, y precipitado con etanol. La presencia de desoxirribonucleósidos de metilo se determinó por HPLC (45, 46). La separación de los desoxirribonucleósidos se realizó en una Phenomenex Luna 5 micras C18, 4.6 x 150 mm. El método fue calibrado sobre la base de la absorción de desoxirribonucleósidos estándar de concentración conocida.

Ejemplo 3: Preparación de las diferentes vacunas y ensayos de protección

1. *Parásitos*: La cepa WB de *Giardia lamblia* (ATCC 30957) fue aislada de un paciente sintomático que se cree que ha adquirido la Giardiasis en Afganistán (Antigenic analysis of *Giardia lamblia* from Afganistan, Puerto Rico, Ecuador, and Oregon. Smith PD, Gillin FD Kaushal NA and Nash TE. Infect. Immun. 1982 May; 36(2): 714-9), y la cepa GS/M fue aislada de un paciente sintomático de los EE.UU. (Antigenic analysis of *Giardia lamblia* from Afganistan, Puerto Rico, Ecuador, and Oregon. Smith PD, Gillin FD Kaushal NA and Nash TE. Infect. Immun. 1982 May; 36(2): 714-9), los clones derivados de la cepa WB, y los trofozoítos transgénicos fueron cultivados a 37°C en medio TYI-S-33 suplementado con 20% de suero adulto (Invitrogen), bilis de bovino (Sigma), y una solución antibiótico/antimicótico (Invitrogen) en tubos de cristal de borosilicato de 12 ml con tapa a rosca (Methods for cultivation of luminal parasite protists of clinical importance. Clark CG, Diamond LS. Clin Microbiol Rev. 2002 Jul; 15(3):329-41). Los clones de *Giardia* que expresaban diferentes proteínas de superficie se obtuvieron mediante dilución limitante en placas de cultivo de 96 pocillos (DeltaLabs) en una cámara anaeróbica (BD) y seleccionados por ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales específicos (A new method for cloning *Giardia lamblia*, with a discussion of the statistical considerations of limiting dilution. Baum KF, Berens RL, Jones RH, Marr JJ. J Parasitol. 1988 Apr; 74(2): 267-9). Los clones reactivos fueron amplificados durante la noche en medio de cultivo y se comprobó la homogeneidad antes de usarlos. Los clones WB 1267 (Mab 5C1), 9B10 (Mab 9B10), A6 (Mab 6E7) y GS/M/H7 (Mab G10/4) fueron utilizados en los experimentos de control y en las infecciones (Nash, T. Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. Parasitol Today 8, 229-234 (1992).

Generación de trofozoítos transgénicos que expresan todo el repertorio de VSPs: Las secuencias complementarias de los genes que codifican para las enzimas de *Giardia* RdRP y Dicer se clonaron en el plásmido pTubHA.pac (Sorting of encystation-specific cysteine protease to lysosome-like peripheral vacuoles in *Giardia lamblia* requires a conserved tyrosine-based motif. Touz MC, Lujan HD, Hayes SF, Nash TE. J Biol Chem. 2003 Feb 21; 278(8):6420-6. Epub 2002 Dec 3. Esto permitió la expresión constitutiva y estable de los genes en los trofozoítos de *G. lamblia* debido a la presencia del promotor de la α -tubulina y de la selección con el antibiótico puromicina. Los genes que codifican las enzimas Dicer y RdRP fueron amplificados por PCR a partir del cDNA del clon WB/9B10 usando Platinum HiFi Taq ADN polimerasa (Invitrogen), usando sondas de oligonucleótidos que contienen los sitios de restricción NcoI y EcoRV y luego clonado en el vector. Los cebadores fueron DAF: 5'-AGT TGA AAC TAT CAT GGT TGC TCC CGA A-3' SEQ ID N° 141, DAR: 5'-CCA CCA TGG TTG AAC GCC GAA TCC AAC-3' SEQ ID N° 142, RAF: 5'-GCG ATA GGT TGC AGT TCC ATG ACG TTC TTG A-3' SEQ ID N° 143, y RAR: 5'-CCA CCA TGG TCG CTA CCT TAG CAT CAT CC-3' SEQ ID N° 144. Las construcciones fueron verificadas por digestión con enzimas de restricción y secuenciación posterior. La verificación del silenciamiento de estas enzimas se realizó por qRT-PCR como fue descrito más arriba.

Transfección de Giardia lamblia: La transfección de *Giardia* se llevó a cabo por electroporación esencialmente como informó (Transient transfection and expression of firefly luciferase in *Giardia lamblia*. Yee J, Nash TE. Proc Natl Acad Sci USA. 1995 Jun 6; 92(12):5615-9). En pocas palabras, cultivos de trofozoítos del clon WB/9B10 creciendo a confluencia en tubos de 12-ml (aproximadamente 10^7 células), se resuspendieron en 0,3 ml de medio TYI -S-33 completo, en cubetas de 0,4 cm. Luego 10-15 μ g del plásmido fueron añadidos a un volumen final de 100 μ l. La mezcla se incubó durante 10 minutos en hielo. Las células fueron electroporadas a 350V, 1000 μ F y 700 Ω en un electroporador BTX. Después de la incubación sobre hielo durante 10 minutos, las células fueron transferidas a un tubo que contenía 12 ml de medio completo y se incubó durante la noche a 37°C en anaerobiosis. Al día siguiente, el medio fue complementado con puromicina y los trofozoítos fueron incubados durante 7-10 días a 37°C. Para obtener líneas de células clonales, se llevó a cabo dilución limitante en placas de 96 pocillos.

Inmunofluorescencia y microscopía confocal: Los trofozoítos se desprendieron de los tubos por enfriamiento durante 20 minutos en hielo. Las células fueron recogidas y se resuspendieron en un medio de crecimiento, aplicados a portaobjetos de vidrio y se incubaron a 37°C en una cámara húmeda durante 1 hora para permitir que los trofozoítos se volvieran a adherir. Las preparaciones fueron lavadas con medio tibio tres veces más dos lavados en PBS tibio. Las células entonces fueron hechas permeables mediante la fijación con 1:1 acetona / metanol durante 30 minutos a -20°C y se bloquean en 1X PBS/0.05% Tween 20, BSA 2,5% durante 30 min. Las células fueron incubadas primero con Mab contra distintos VSPs diluidos en 1X PBS/0.05 Tween 20, BAS 2,5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los diferentes VSPs fueron: mAb 9B10 (anti-VSP-9B10B), mAb 5C1 (anti-VSP 1267), mAb 6E7 (anti-VSP A6), mAb 1B2 (anti-VSP S1), mAb 2D5 (anti-VSP S2), mAb 2E1 (anti-VSP S3), mAb 2G10 (anti-VSP S4), mAb 6F8 (anti-VSP S5), mAb 7A9 (anti-VSP S6), mAb 7B8 (anti-VSP S7), mAb 7C2 (anti-VSP S8), mAb 7C9 (anti-VSP S9), mAb 7C10 (anti-VSP S10), mAb 7D4 (anti-VSP S11), mAb 2D4 (anti-VSP S12), mAb 3B8 (anti-VSP S13), mAb 4A2 (anti-VSP S14), mAb 7F4 (anti-VSP S15), mAb 7H2 (anti-VSP S16). Después de la incubación con el anticuerpo monoclonal correspondiente, los portaobjetos se lavaron dos veces con 1x PBS/0.05 Tween 20, y después fueron incubados con un segundo anticuerpo de cabra anti-inmuglobulina de ratón marcado con FITC o TRITC en una dilución 1/200 durante 1 hora en solución de bloqueo. Los núcleos fueron contrastados con DAPI. Se obtuvieron imágenes confocales mediante un microscopio láser LSM5 Zeiss Pascal confocal equipado con un láser argón/helio/neón, y un objetivo de inmersión en aceite X100 (apertura numérica = 1,4) (Zeiss Plan Aplanachromat). Se tomaron secciones confocales de 0,3 micras paralelas al cubreobjetos (secciones z). Las imágenes fueron obtenidas utilizando una cámara Zeiss junta al dispositivo y

procesada con el LSM y el software Adobe Photoshop. Porcentaje de células que expresan un VSPs particular se calculó mediante el recuento de 500 células en los experimentos por triplicado o por Citometría de Flujo.

5 *Producción de anticuerpos monoclonales contra la cola ácida 5-amino de VSPs:* La producción de anticuerpos monoclonales contra la cola ácida 5-amino de VSPs se llevó a cabo tal como se describe más arriba en el ejemplo 2.

10 2. *Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blotting:* Los extractos proteicos de trofozoítos fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot como se informó (Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Conrad, J.T., Bowers, B. & Nash, T.E. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J Biol Chem* 270, 29307-29313 (1995).

15 *Animales:* Todos los procedimientos realizados en animales se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad Católica de Córdoba y la pauta de inmunización fue bien tolerada por todos los animales. Jerbos machos endocriados, especímenes libres de patógenos (SPF) de 6-semanas de edad (*Meriones unguiculatus*) se obtuvieron del Bioterio de animales de investigación de la Universidad Católica de Córdoba y fueron alojados individualmente en cajas con aire acondicionado (18-22 ° C, 40-50% de humedad) (Techniplast) con un ciclo de 12-horas-luz, 12-horas-oscuridad. Se les dio comida autoclavada y agua estéril, complementada con una solución mezcla de vitaminas esterilizada por filtración, ad libitum. En este estudio, sólo los animales nacidos en nuestras instalaciones fueron utilizados para asegurar que nunca fueron infectados con el parásito *Giardia* o cualquier otro relacionado. Todos los animales fueron mantenidos bajo condiciones de laboratorio SPF de acuerdo a la norma y los reglamentos del Consejo Argentino de Cuidado de Animales y las normas de atención internacional de los animales. Antes de la infección, se ensayó en los jerbos la negatividad de los anticuerpos séricos contra la *Giardia Lamblia* o proteínas de *Giardia* por ELISA utilizando un preparado de proteínas totales extraídas de trofozoítos y quistes. Después de las infecciones, algunos grupos de animales control fueron tratados oralmente con 20 mg de metronidazol durante 3 días, 10 días antes de desafíos, para descartar cualquier posible presencia de bajos niveles de *Giardia* en sus intestinos

20 *Eliminación de los parásitos protozoarios a través de tratamiento con metronidazol:* Para iniciar el tratamiento, los animales fueron colocados en jaulas estériles con aire filtrado, el agua y alimentos fueron esterilizados en autoclave. Se preparó una solución de trabajo de 100 mg/ml de Metronidazol. 500 µl de esta solución fue dada a los animales por vía oral en una sola dosis por día durante tres días consecutivos. Los cuatro días siguientes, los animales no recibieron antibióticos. El tratamiento continuó durante dos días con 500 µl de la solución de trabajo de metronidazol. El tratamiento se complementó con la adición de 2 ml de metronidazol en 400 ml de agua potable autoclavada que es la única agua que los animales pueden ingerir durante todo el tratamiento (los animales ingieren esta solución diluida en metronidazol durante nueve días). Las heces se recogieron diariamente durante todo el tratamiento y el control microscópico por ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal 7D2 (anti-proteína 2 de la pared del quiste (Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucin-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. Lujan HD, Mowatt MR, Conrad JT, Bowers B, Nash TE. *J Biol Chem*. 1995 Dec 8; 270(49):29307-13) todos los días para determinar la presencia de quistes. La flora normal del animal sufrió durante el tratamiento un aumento de las levaduras, regresando a su estado normal pocos días después de terminado el tratamiento.

35 3. *Infecciones:* Las infecciones fueron inducidas en los Jerbos por inoculación orogástrica de 2×10^5 trofozoítos o de 1×10^2 quistes resuspendidos en 0,5 ml de solución buffer de fosfatos (PBS). Algunos animales control recibieron 0,5 ml de PBS por la misma ruta. Se utilizaron quistes frescos recogidos de los jerbos infectados para evitar la rápida pérdida de la viabilidad e infectividad que se produce en las muestras obtenidas de pacientes infectados. La recolección de materia fecal de los jerbos infectados se realizó diariamente desde el día 0 hasta el día 30. Los quistes o trofozoítos se identificaron visualmente por microscopía o por ensayos de inmunofluorescencia utilizando antígenos específicos del quiste (Mab 7D2) o del trofozoíto (BIP; Mab 9C9).

40 4. Periódicamente, los jerbos seleccionados al azar fueron sacrificados y los intestinos delgados fueron aislados, se abrió una rendija longitudinalmente y se suspendido en el medio de cultivo a 4°C durante 30 min. Los sobrenadantes fueron recogidos y analizados para trofozoítos de *Giardia* por microscopía clásica y de fluorescencia o colocados en medio de cultivo hasta seis días según lo informado por (Gottstein, B., Deplazes, P. & Tanner, I. *In vitro* synthesized immunoglobulin A from nu/+ and reconstituted nu/nu mice against a dominant surface antigen of *Giardia lamblia*. *Parasitol Res* 79, 644-648 (1993)).

55 Los quistes de *Giardia* excretados por los jerbos fueron cuantificados por recolección de las heces de los animales alojados individualmente durante un período de 24 horas. Las muestras de heces fueron pesadas, resuspendidas en 2 ml de PBS, y se filtraron a través de 3 capas de gasa. El filtrado se centrifugó a 250 g durante 10 min en una centrífuga refrigerada (Beckman) a 4 °C. Después de 3 lavados, se suspendió el pellet en 2 ml de PBS; los quistes teñidos con FITC marcado con Mab 7D2, y contados en un hemacitómetro. Los jerbos fueron considerados no infectados si no se encontró un quiste en las heces o si no se detectaron trofozoítos después de 6 días en cultivo.

60

Purificación de VSPs de Dicer-AS y RDRP-AS de trofozoítos transgénicos: El repertorio completo de VSPs expresados en estos trofozoítos transgénicos generados tal como se describió fueron purificados por inmunoafinidad utilizando el Mab 12F1 de la invención generado contra los 5 aminoácidos de la cola conservada de las VSPs. Para aislar las inmunoglobulinas del líquido ascítico de ratón producido por la inyección IP de un cultivo de células de hibridomas se utilizó proteína A/G-Sepharose (Amersham). El Mab purificado se unió a esferas magnéticas (Dyna) y las esferas se utilizaron para purificar las VSPs a partir de fracciones microsomales de trofozoítos que contienen membranas plasmáticas. Las VSPs purificadas se resuspendieron en PBS con 0,01% de Tween 20, cuantificadas, y se utilizaron para inmunizar a los jerbos por vía oral. Las VSPs fueron purificadas por el mismo método utilizando Mab específico.

Purificación de Giardia GRP78/BiP: Los trofozoítos de *G. lamblia* aislados del clon 9B10 WB fueron transfectados con el plásmido pTubHA.pac que contienen la secuencia de longitud completa de la chaperona BiP/GRP78 del retículo endoplásmico de la *Giardia* (Increased expression of the molecular chaperone BiP/GRP78 during differentiation of a primitive eukaryote. Lujan HD, Mowatt MR, Conrad JT, Nash TE. *Biol Cell*. 1996; 86(1):11-8) y tres copias de este epítipo señalado con Hemaglutinina (HA-BiP). Los trofozoítos transgénicos fueron lisados con el buffer RIPA y la proteína BiP aislada utilizando el Kit de inmunopurificación anti-HA (Sigma).

Inmunizaciones orales: Los animales fueron inmunizados con tres administraciones orales sucesivas de 200 µg de proteínas del parásito suspendidas en PBS/0.01% de Tween 20 estériles, tres días de diferencia entre cada administración. La misma cantidad de proteínas se administró a los jerbos cuando se utilizaron BiP, preparados de membrana, o VSPs purificadas como inmunógenos.

Muestras de sangre: Las muestras de sangre fueron recolectadas después del primer día de la infección o inmunización para detectar la presencia de anticuerpos circulantes como se describe a continuación. Los jerbos fueron anestesiados con éter y sangrado del plexo orbital o punción intracardiaca. El suero fue recogido por centrifugación de la muestra de sangre a 800 xg durante 15 min y almacenados a -70 ° C hasta su uso. Los jerbos fueron sacrificados con dióxido de carbono gaseoso.

5. *Contenidos intestinales:* Las secreciones del intestino delgado de los jerbos infectados, no infectados e inmunizados se recogieron como se realizó en ratones (Heyworth, M.F. Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. *J Parasitol* 78, 73-76 (1992).

En resumen, los jerbos ayunaron durante un día con el acceso al agua y luego fueron sacrificados. Se extrajo el intestino delgado desde el duodeno hasta el ciego y su contenido aspirado con una jeringa y recogidos por separado. En algunos casos, el contenido intestinal se centrifugó a 5.000 xg a 4°C para separar células, restos, y bacterias. En algunos experimentos, se lavó el lumen del intestino delgado, cinco veces con 3 ml de PBS frío y se centrifugó como se describe más arriba. Los sobrenadantes fueron esterilizados por filtración y mantenidos a -70 ° C hasta su uso.

Ensayos de aglutinación: Los ensayos fueron realizados en placas de 96 huecos de fondo plano. Aproximadamente 5×10^5 trofozoítos fueron incubados a 4°C por 1 h con varias diluciones de las secreciones intestinales de los animales, suero, o líquido ascítico que contenía anticuerpos específicos contra VSPs (todos inactivados por calor) en el medio TYI-S-33 sin suero bovino adulto. Se mezclaron y se ensayó la aglutinación de los trofozoítos mediante microscopía. La unión de los anticuerpos a la superficie del parásito se demostró con inmunoglobulinas de cabra anti ratón marcadas con TRITC.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Conicet
Luján, Hugo
- <120> Protozoo modificado que expresa al menos dos proteínas variables de superficie (VSP), vacuna que lo comprende, procedimientos, usos y métodos
- <130> Conicet
- <160> 144
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> *Giardia intestinalis*
- <400> 1
gtttgttct cgcggggta ctcgt 25
- <210> 2

ES 2 667 773 T3

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 2
 5 agagcgcgcg gctcaatgcg cag 23

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 3
 10 gattgcatgg gcaggaaaag caa 23

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 4
 15 tctcgatgta acacaggatt tgt 23

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> n is a, c, g, or t
 25 <400> 5
 30 ggacaatgtg cagacnnaga agg 23

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 6
 35 aaagatggct ccggaggcga taca 24

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 7
 40 cagacctgtg gacagtgcgc cgag 24

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 8
 50 ctttcatgta caagggcggc tgt 23

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n is a, c, g, or t
 60 <400> 9
 cgaagcancc cagcagcccg gacag 25

65

<210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 10
 5 gcaaggatac ttcgtgccgc cgg 23

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 11
 10 accaatcggc cataccatgc ggag 24

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 12
 15 acgataaaaa gtacaagggc gtgct 25

<210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 13
 20 accggcacca agacgtgcaa gac 23

<210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 14
 25 tgcgacgtgc gagaagggcg ccga 24

<210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 15
 30 gcccgacccn nagtgcaaca ccccc 25

<210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 16
 35 gctgcaagac gtgcagtgag ccga 24

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 17
 40 agacaagcaa ggaggtgtgc nca 23

<210> 18
 45

	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 18	
5	acggttgta gcacctggaa ggc	23
	<210> 19	
	<211> 23	
	<212> DNA	
10	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 19	
	cctgtgcaa gtgcaatacc tcg	23
	<210> 20	
15	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 20	
20	agctacgaag gagagggcac gggg	24
	<210> 21	
	<211> 24	
	<212> DNA	
25	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 21	
	tcggcccgc cagcctcctg ccag	24
	<210> 22	
30	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Giardia intestinalis	
	<220>	
35	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(14)	
	<223> n is a, c, g, or t	
	<400> 22	
	acgaaacgac caanctcct ggaa	24
40	<210> 23	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 23	
45	tgaataatgg cgcgctcatc actg	25
	<210> 24	
	<211> 23	
	<212> DNA	
50	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 24	
	gatgtaagac gtgcaccagc cag	23
	<210> 25	
55	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 25	
60	tactacctgt ccaaagaaaa gtg	23
	<210> 26	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Giardia intestinalis	
65	<400> 26	

	cccccaacca acaataaagg gcc	23
5	<210> 27 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <220> <221> misc_feature <222> (16)..(17) <223> n is a, c, g, or t <400> 27	
	acctcataca gaacannaac agg	23
15	<210> 28 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 28	
20	gggatctccg tcgctgtcat cgc	23
25	<210> 29 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <220> <221> misc_feature <222> (21)..(21) <223> n is a, c, g, or t <400> 29	
30	tgctggtggt tcatatgtag ngg	23
35	<210> 30 <211> 22 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 30	
40	gcaagcactc ttgcaggagc tt	22
45	<210> 31 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 31	
	gctctacgac tcaggctaataat tgt	23
50	<210> 32 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 32	
55	caacgggggtg tgtgaagcag ccgc	24
60	<210> 33 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 33	
	gtaagaagtg cctctgcaa acc	23
65	<210> 34 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	

	<400> 34 caaacctca tgttcaaggg cgg	23
5	<210> 35 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
10	<400> 35 tgatgctgcc tctgtacta ctgg	24
15	<210> 36 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
	<400> 36 gcggtgata ccacggattc ctgt	24
20	<210> 37 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
25	<400> 37 caactggggt cacgattgt gag	23
30	<210> 38 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(14) <223> n is a, c, g, or t	
35	<400> 38 actaattgcg ttnggtac caaa	24
40	<210> 39 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
	<400> 39 gagtgtgctt ccaatctgta tctg	24
45	<210> 40 <211> 25 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
50	<400> 40 gaaactgca agacaggata ttcc	25
55	<210> 41 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
	<220> <221> misc_feature <222> (6)..(6) <223> n is a, c, g, or t	
60	<400> 41 tttcntaat gataacgctg ata	23
65	<210> 42 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	

ES 2 667 773 T3

	<400> 42 ccggtgctat tcttatcacc tgca	24
5	<210> 43 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 43 gcaaggacga caacactgcg gcc	23
10		
15	<210> 44 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <220> <221> misc_feature <222> (22)..(22) <223> n is a, c, g, or t	
20	<400> 44 gtatcgcaga gtgcacggga ang	23
25	<210> 45 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 45 ggcagtgcac agctagcata gcag	24
30	<210> 46 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 46 cctttgcgtg tcggccgaaa cag	23
35		
40	<210> 47 <211> 25 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 47 taaaaccaac ggagtttgca ctgcc	25
45	<210> 48 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 48 ctatcaggct gagaagttc ctg	23
50		
55	<210> 49 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 49 gcaggaaagt gcacgacctg tgcg	24
60	<210> 50 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 50 ggaaacctg gtaggattat ttgc	24
65		

<210> 51
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 5
 <400> 51
 aatgctaadc tgtacctgaa ggct 24
 <210> 52
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 52
 10
 ggcatagatg ggtgctctgc atg 23
 <210> 53
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 53
 15
 acaaaggaa catgcattgc aga 23
 <210> 54
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 54
 20
 acgccggata anaccaacgg agtt 24
 <210> 55
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 55
 25
 tgtgcaanng ataactaa na 22
 <210> 56
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 56
 30
 ctctgctggt tcctctgctg gtg 23
 <210> 57
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 57
 35
 acccccgcga gaacaaaact gcc 23
 <210> 58
 <211> 23
 <212> DNA

	<213> Giardia intestinalis <400> 58 tcctgcccat gcaatctgga cga	23
5	<210> 59 <211> 25 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 59 attgagccgc gcgctctgtt gcttt	25
10		
15	<210> 60 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 60 atgcttctc tgcgcaatta gtgt	24
20	<210> 61 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 61 caatacaatt taccaccgat cag	23
25		
30	<210> 62 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 62 tgcacattgt ccattgatag gaa	23
35		
40	<210> 63 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 63 ctgatcagct gtatcgctc cgg	23
45	<210> 64 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 64 gtaacagccg ccctgtaca tga	23
50	<210> 65 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <220> <221> misc_feature <222> (12)..(12)	
55	<223> n is a, c, g, or t <220> <221> misc_feature <222> (17)..(18)	
60	<223> n is a, c, g, or t <400> 65 catctgccgc cngacanntg gtc	23
65	<210> 66 <211> 23	

ES 2 667 773 T3

	<212> DNA	
	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 66	
5	cccggcggca cgaagtatcc ttg	23
	<210> 67	
	<211> 23	
	<212> DNA	
10	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 67	
	accgattggt gagaggcgtc tgc	23
	<210> 68	
	<211> 24	
15	<212> DNA	
	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 68	
	acttttatc gttctaact gtta	24
20	<210> 69	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Giardia intestinalis	
25	<400> 69	
	tgtgggagcg taacaccgag tgc	23
	<210> 70	
	<211> 23	
30	<212> DNA	
	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 70	
	cacgcagtac acgtggcggc ctt	23
35	<210> 71	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Giardia intestinalis	
40	<400> 71	
	cacgcaggag gtgctgagt cct	23
	<210> 72	
	<211> 23	
	<212> DNA	
45	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 72	
	gtgccggtgc actctcttc tgt	23
	<210> 73	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Giardia intestinalis	
50	<400> 73	
	ttgttggct ggaccttctt att	23
55		
	<210> 74	
	<211> 24	
	<212> DNA	
60	<213> Giardia intestinalis	
	<400> 74	
	gcactcaccg tctccgggca cttt	24
65	<210> 75	
	<211> 23	

<212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 75
 5 gcttctcgt gcacccggtg ccc 23

 <210> 76
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 76
 20 ctgggcctt cgtagtncc tncc 24

 <210> 77
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 25 <400> 77
 tgaggacctg cttaggctcg cag 23

 <210> 78
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (10)..(10)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 78
 cttctgacn cacacgccgt tctc 24

 <210> 79
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 79
 45 tagcagcccc cgttcatgcg gaa 23

 <210> 80
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 50 <400> 80
 acctctcac agacgctctt tcca 24

 <210> 81
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 81
 60 gcttgatcc gtcggccgga gtc 23

 <210> 82
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 65

ES 2 667 773 T3

<400> 82
 cactcggagc acccagtggc gca 23

 5 <210> 83
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 83
 10 cacttggtag cgctgtccgc attg 24

 <210> 84
 <211> 25
 <212> DNA
 15 <213> Giardia intestinalis

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 20 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 84
 acagcgnccg agatccccgc tatgg 25

 25 <210> 85
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 85
 30 agaggaagcc caccgagccc cc 22

 <210> 86
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 35 <400> 86
 ggcaattaat taatagaac at 22

 <210> 87
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 40 <400> 87
 gctattagc aattaattaa tag 23

 45 <210> 88
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 50 <400> 88
 ttccgcaaca caattagcct gag 23

 <210> 89
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 55 <400> 89
 tgcacttgt attactactg gcg 23

 60 <210> 90
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 65 <400> 90
 gcacttcta caagtctgat cag 23

5 <210> 91
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> n is a, c, g, or t
 10 <400> 91
 ttaaattacc agtnnctccc gct 23
 15 <210> 92
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 92
 20 attactctca ccaatcgtga cccc 24
 <210> 93
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n is a, c, g, or t
 30 <400> 93
 gcgtnatcat tagggaaata tcc 23
 <210> 94
 <211> 24
 <212> DNA
 35 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> n is a, c, g, or t
 40 <400> 94
 ttaagggnnc tcaggctatt cgtg 24
 <210> 95
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 95
 tcaggacaga cccnggtag cag 23
 55 <210> 96
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 96
 60 cgtcggcgca gtttccaaa tac 23
 <210> 97
 <211> 25
 <212> DNA
 65 <213> Giardia intestinalis

	<400> 97 agtgcaaac tccggtggtt tatcc	25
5	<210> 98 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 98 gcatcggctg tcgtgcacaa cgt	23
10	<210> 99 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <220> <221> misc_feature <222> (12)..(12) <223> n is a, c, g, or t <400> 99 gccgctggtc tngacgtagc agg	23
15	<210> 100 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 100 agtcgtagag caagctcctg caag	24
20	<210> 101 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 101 accccgttga tgggcacata gttt	24
25	<210> 102 <211> 25 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <220> <221> misc_feature <222> (11)..(12) <223> n is a, c, g, or t <400> 102 cttccgtctt nnaaataatc ctacc	25
30	<210> 103 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 103 gaatcgtaac cccggtgcg tcg	23
35	<210> 104 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis <400> 104 acttagcaca accggccaca ccc	23
40	<210> 105 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 667 773 T3

	<400> 105 cttatcagcc gtactacagg taag	24
5	<210> 106 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
10	<400> 106 acggtgctag ccctagttgt aga	23
15	<210> 107 <211> 25 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
20	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(14) <223> n is a, c, g, or t <400> 107 cgttctcaa ggnnctcaga ttgt	25
25	<210> 108 <211> 22 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
30	<400> 108 ctctgcaatg catgttcct tt	22
35	<210> 109 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
40	<400> 109 cgaccgggt ggtgccgctc ttgc	24
45	<210> 110 <211> 23 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
50	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(13) <223> n is a, c, g, or t <400> 110 ccattgctgt ctntatcttg ccc	23
55	<210> 111 <211> 22 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
60	<220> <221> misc_feature <222> (11)..(11) <223> n is a, c, g, or t <400> 111 gtgttatctt ngcacacgat gc	22
65	<210> 112 <211> 24 <212> DNA <213> Giardia intestinalis	
	<400> 112	

ES 2 667 773 T3

	gacgggagta gaactctgag gaga	24
5	<210> 113 <211> 16 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador sentido S1 <400> 113	
10	cvtgtgchrr stgcaa	16
15	<210> 114 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador sentido S2 <400> 114	
20	tgcacsrct gcyabcc	17
25	<210> 115 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador sentido S3 <400> 115	
30	tagtgydsyv mvtgyaa	17
35	<210> 116 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador sentido S4 <400> 116	
40	cgatcatgac gggcttct	18
45	<210> 117 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador antisentido R1 <400> 117	
50	ccbacgaggc cyccsacgac	20
55	<210> 118 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador antisentido R2 <400> 118	
60	cgccttcck ckrcakayga	20
65	<210> 119 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador sentido para vsp1267	

ES 2 667 773 T3

	<400> 119 atgttggtga tagccttcta tc	22
5	<210> 120 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador antisentido vsp1267	
10	<400> 120 ctacgccttc cccctgcata tg	22
15	<210> 121 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador hacia adelante vsp9B10	
20	<400> 121 atgtttggca gtttgttct c	21
25	<210> 122 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador antisentido vsp9B10	
30	<400> 122 tcacgccttc cctctacata tg	22
35	<210> 123 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador HL60 gDicer	
40	<400> 123 tggcggcgtc gtatcagtta t	21
45	<210> 124 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador HL161 gDicer	
50	<400> 124 tccccgcacg caagaagaa	19
55	<210> 125 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador HL164 gAgo	
60	<400> 125 attgccccct acggtgtc	18
65	<210> 126 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador HL165 gAgo	

ES 2 667 773 T3

	<400> 126 ctctgccggc cttcctac	18
5	<210> 127 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador HL187 gRdRP	
10	<400> 127 catgggtgc agtttctga cga	23
15	<210> 128 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador HL188 gRdRP	
20	<400> 128 agccccttat ctgtgcctc ctc	24
25	<210> 129 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador HL 183 CWP1	
30	<400> 129 tcgccctgga tgttcggac a	21
35	<210> 130 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador HL184 CWP1	
40	<400> 130 aggcgggtga ggcagta	17
45	<210> 131 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador HL185 GDH	
50	<400> 131 agtggggcgg gtcttactc a	21
55	<210> 132 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador HL186 GDH	
60	<400> 132 tgttcgcgcc catctggtag ttct	24
65	<210> 133 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador F RdRP_F	
	<400> 133	

	tatgtttta ctgatggcgc agg	23
5	<210> 134 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador RdRP_F 2 <400> 134	
10	tacgtcttta ccgatggcgg agg	23
15	<210> 135 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador RdRP_R <400> 135	
20	tcacccatcca ggctcgtgcc	20
25	<210> 136 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador RdRP_R 2 <400> 136	
30	tcaccgtcca ggtcactgcc	20
35	<210> 137 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador de secuenciamiento F <400> 137	
40	ctgtgcata gtaaacaag	20
45	<210> 138 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador de secuenciamiento R <400> 138	
50	caaatggtcg atgctggg	18
55	<210> 139 <211> 51 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> MCSnewSense <400> 139	
60	gattccgggc ccagatctat cgatcgcgt atgcattcgc gagatatctg c	51
65	<210> 140 <211> 52 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> MCSnewAntisense <400> 140	

ES 2 667 773 T3

	gcggccgcag atatctcgcg aatgcatacg cgtatcgata gatctgggcc cg	52
5	<210> 141 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador DAF <400> 141	
10	agttgaaact atcatgggtg ctcccgaa	28
15	<210> 142 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador DAR <400> 142	
20	ccaccatggt tgaacgccga atccaac	27
25	<210> 143 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador RAF <400> 143	
30	gcgataggtt gcagttccat gacgttcttg a	31
35	<210> 144 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> cebador RAR	
40	<400> 144 ccaccatggt cgctacctta gcatcatcc	29

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Protozoo parásito modificado *Giardia* en el que el gen Dicer, el gen ARN-polimerasa ARN-dependiente (RdRP) o ambos han sido silenciados mediante ingeniería genética, comprendiendo así una expresión simultánea en su superficie de más de una proteína variable de superficie.
- 2.- Protozoo según la reivindicación 1, caracterizado porque muestra una expresión reducida de enzimas seleccionadas del grupo que comprende Dicer, ARN-polimerasa ARN-dependiente (RdRP) o ambos.
- 10 3.- Vacuna contra infecciones producidas por protozoos, caracterizada porque comprende al menos un protozoo modificado según la reivindicación 1, y excipientes y/o adyuvantes.
- 4.- Vacuna según la reivindicación 3, caracterizada porque dicho protozoo muestra una expresión reducida de enzimas seleccionadas del grupo que comprende Dicer, ARN-polimerasa ARN-dependiente (RdRP) o ambos.

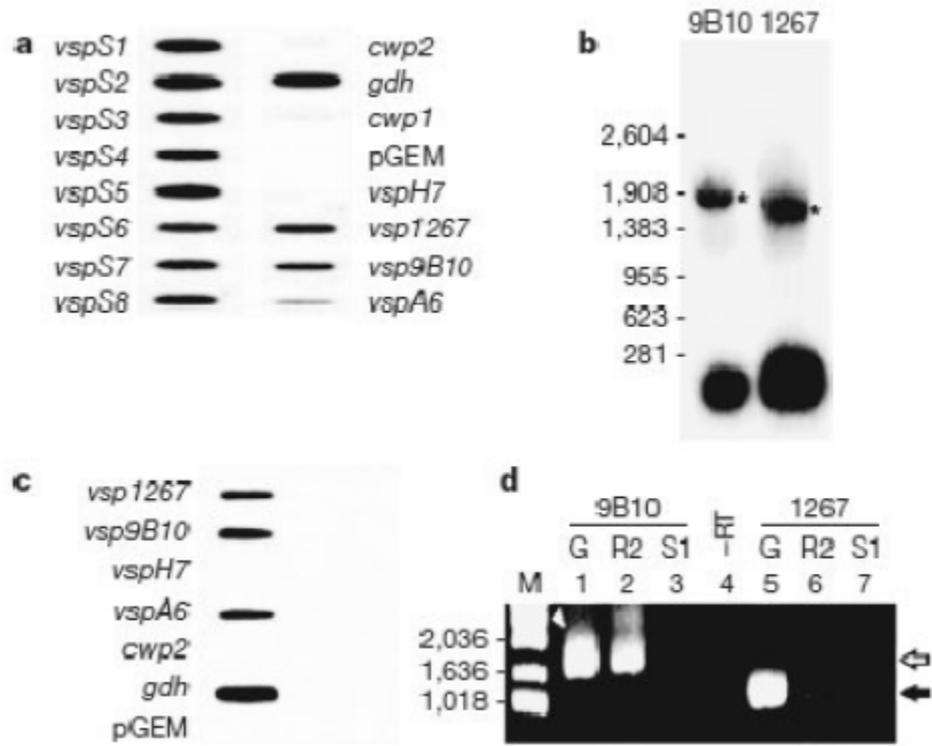


Figura 1

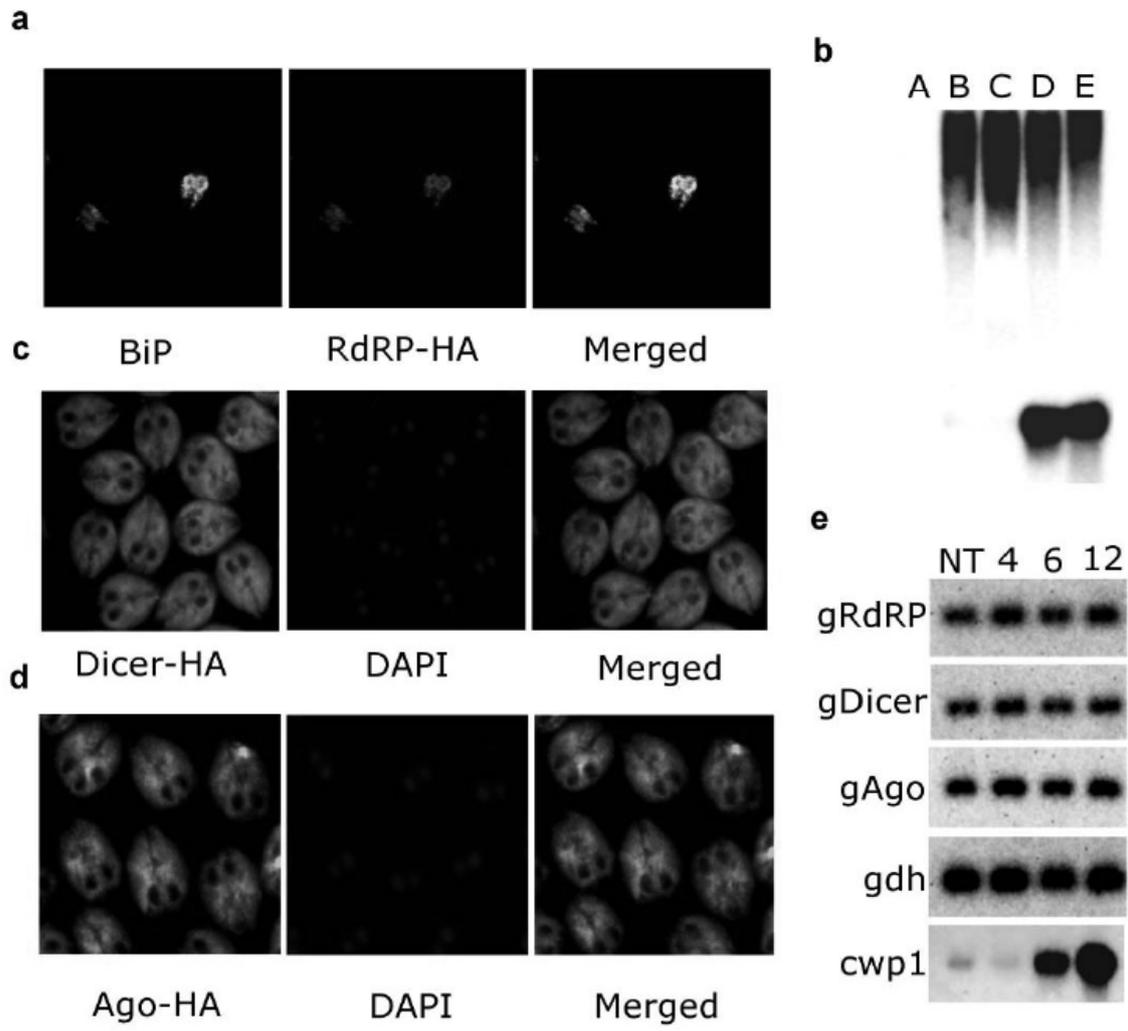


Figura 3

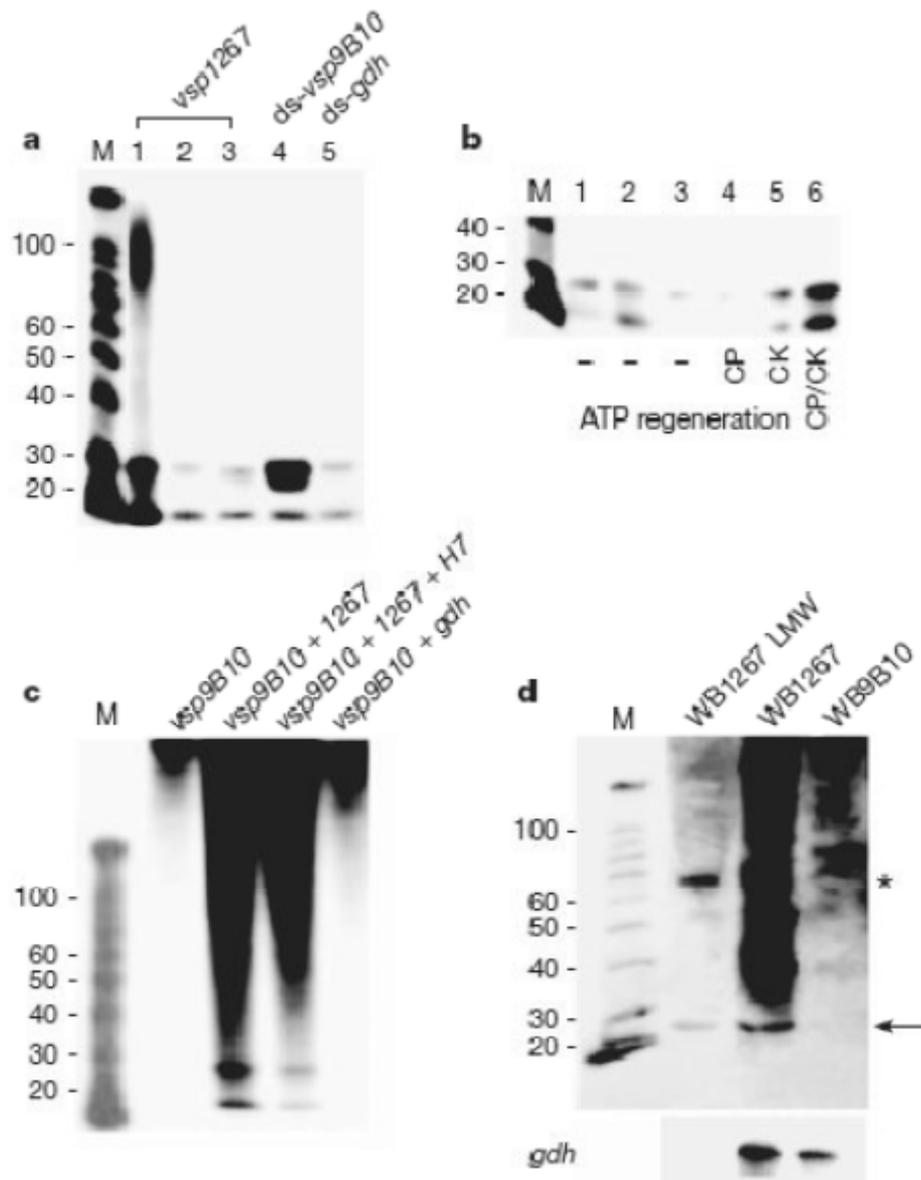


Figura 4

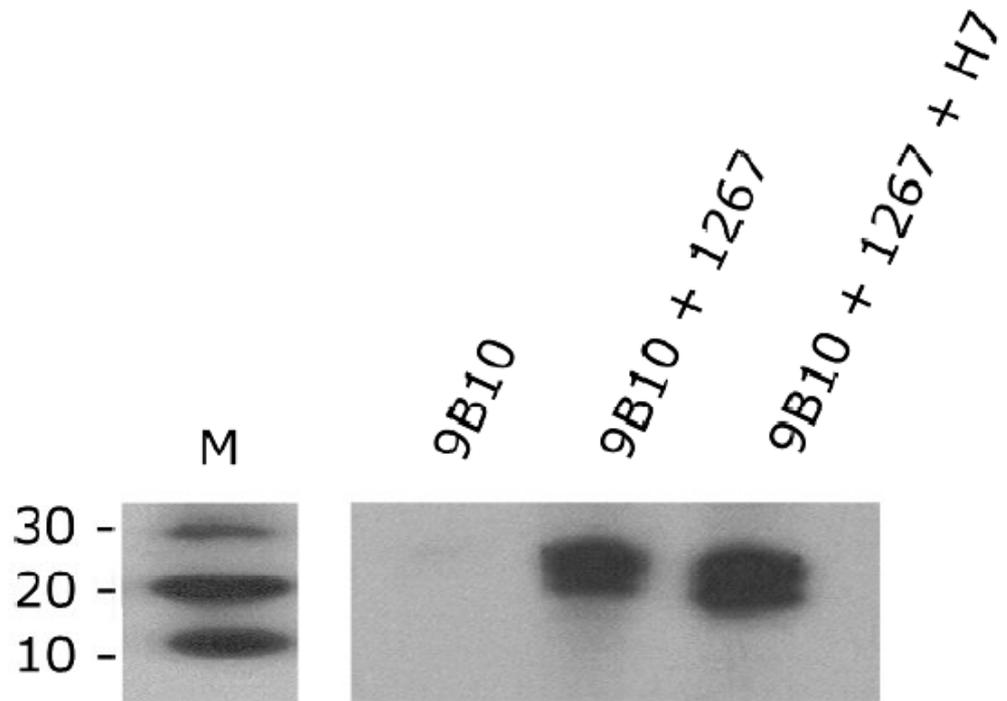


Figura 5

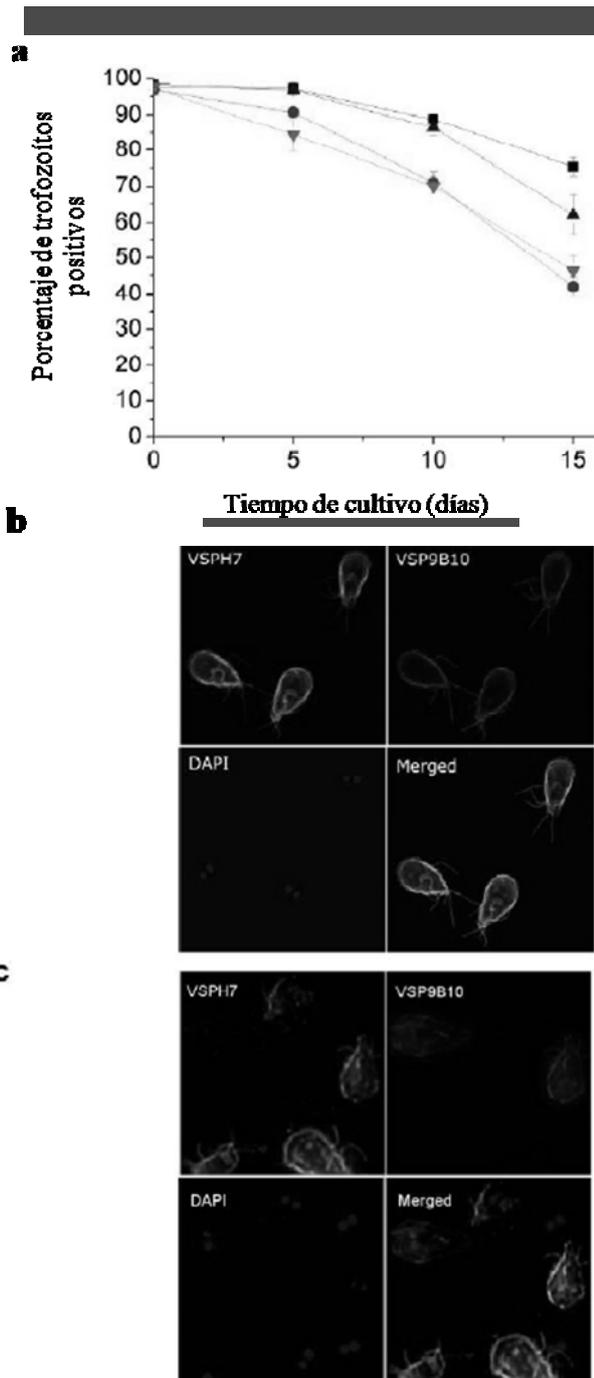


Figura 6

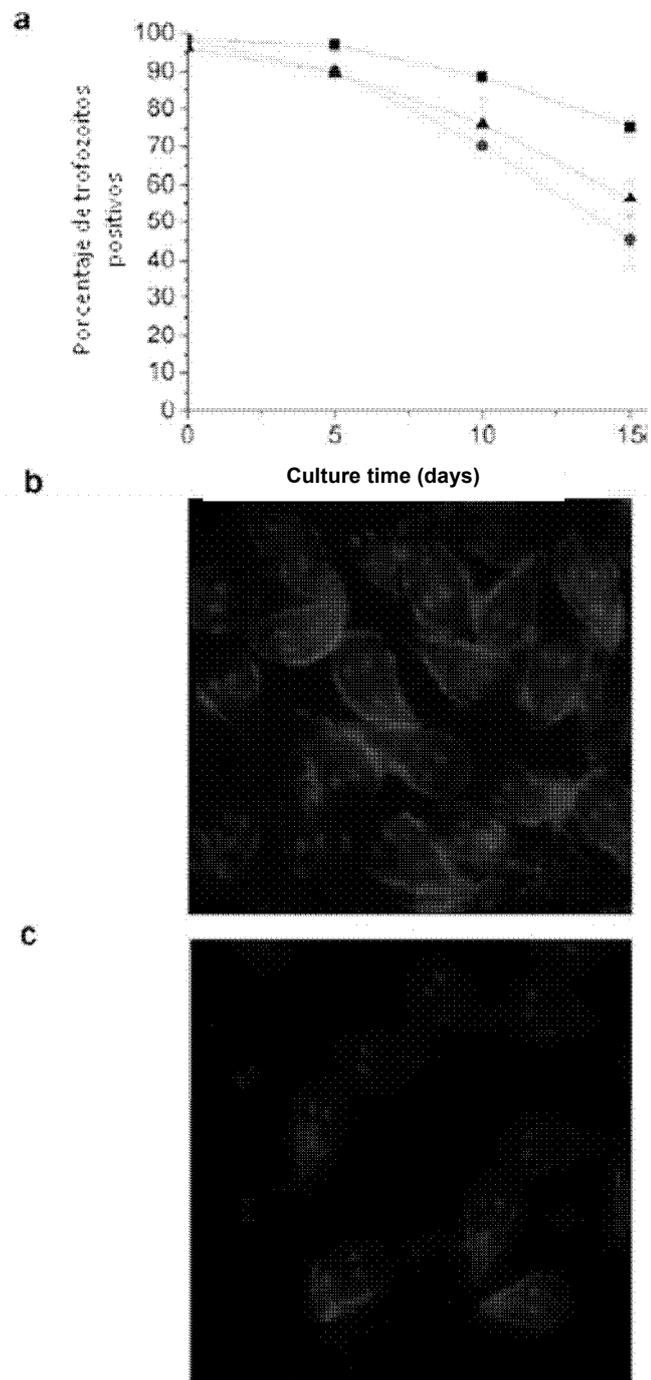


Figura 7

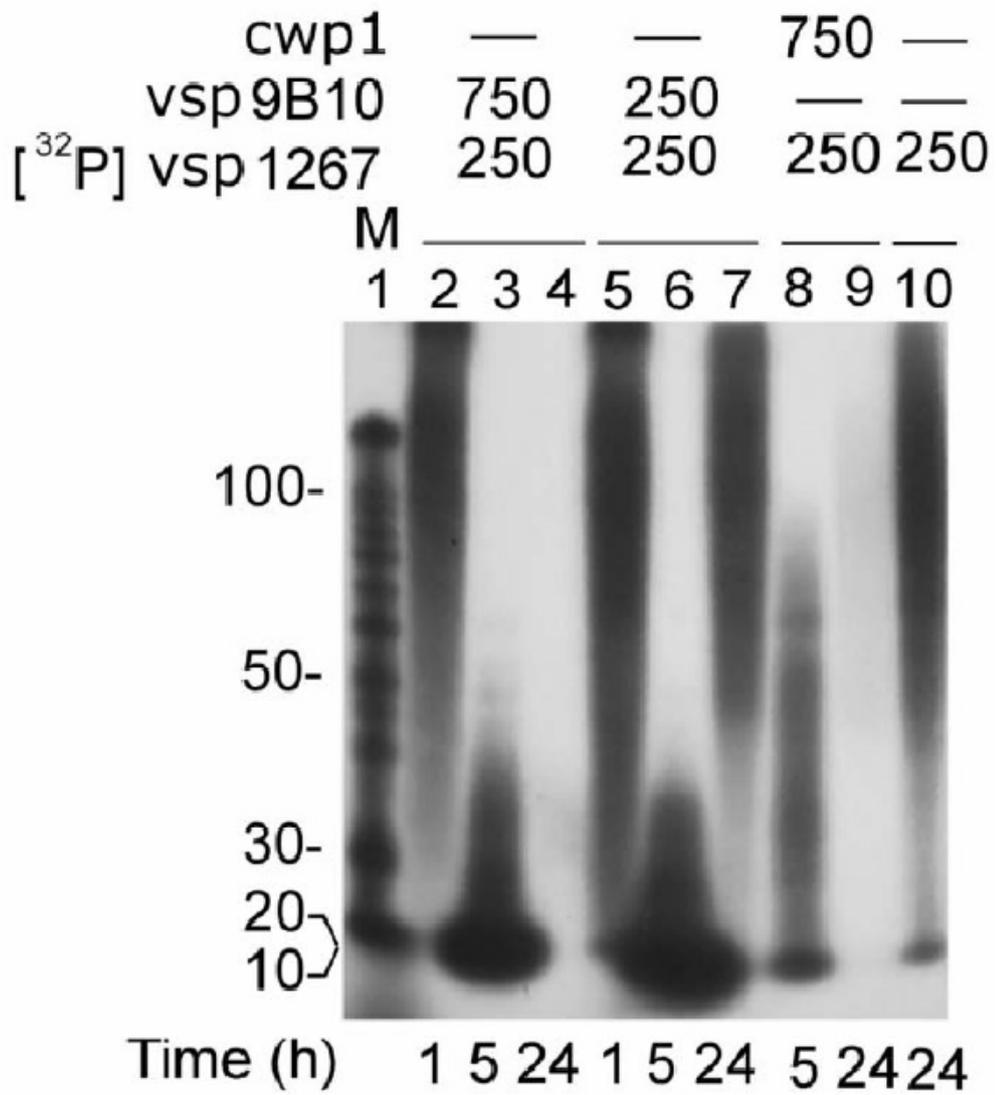
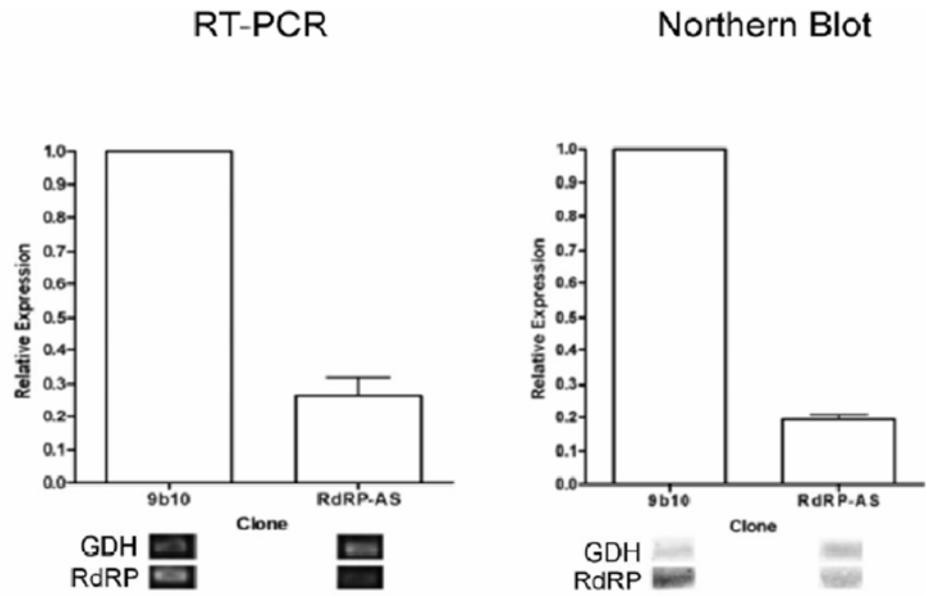


Figura 8

Expresión relativa de RdRP



Expresión relativa de Dicer

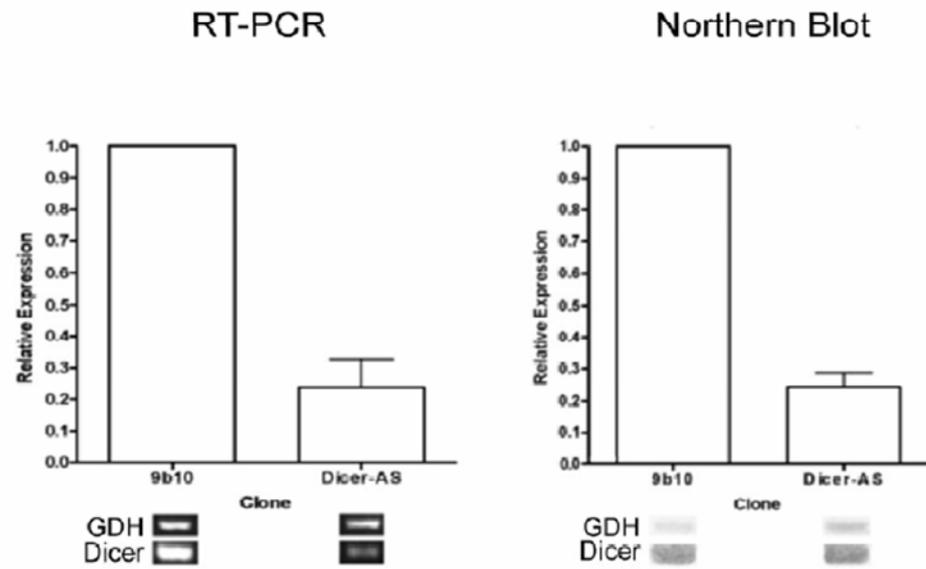


Figura 9

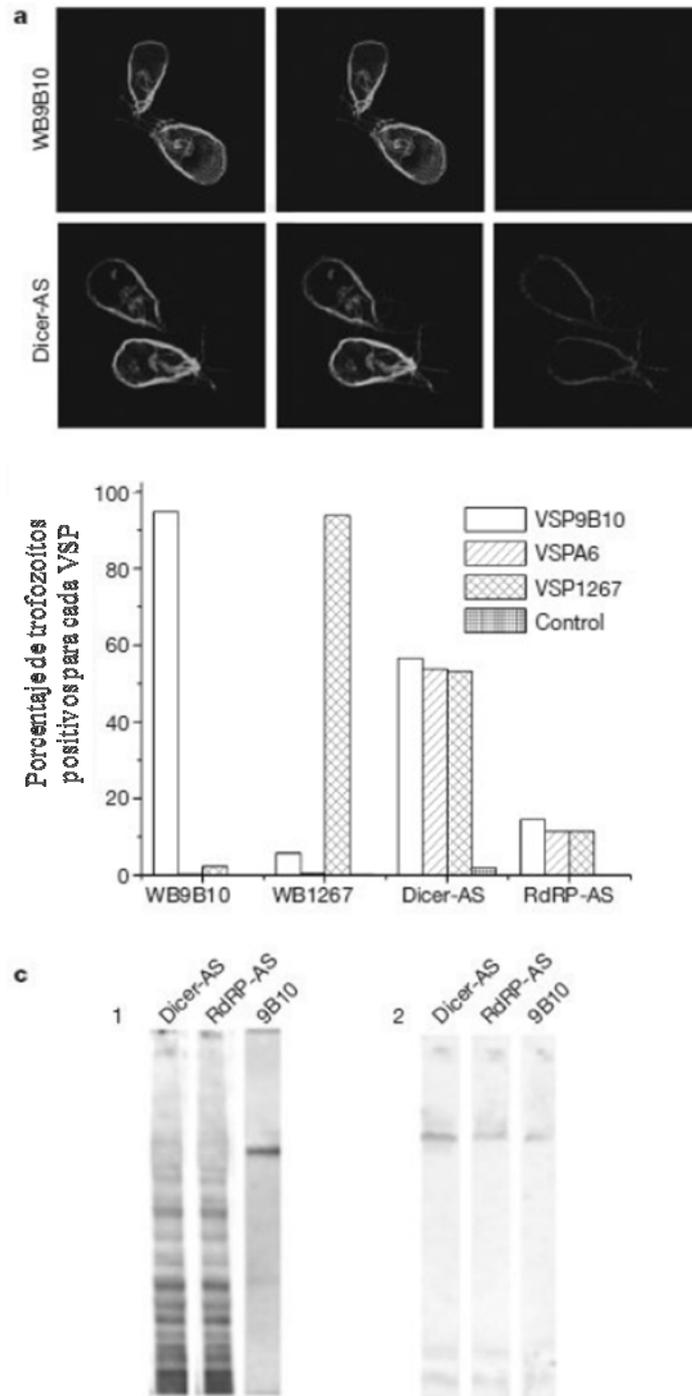


Figura 10

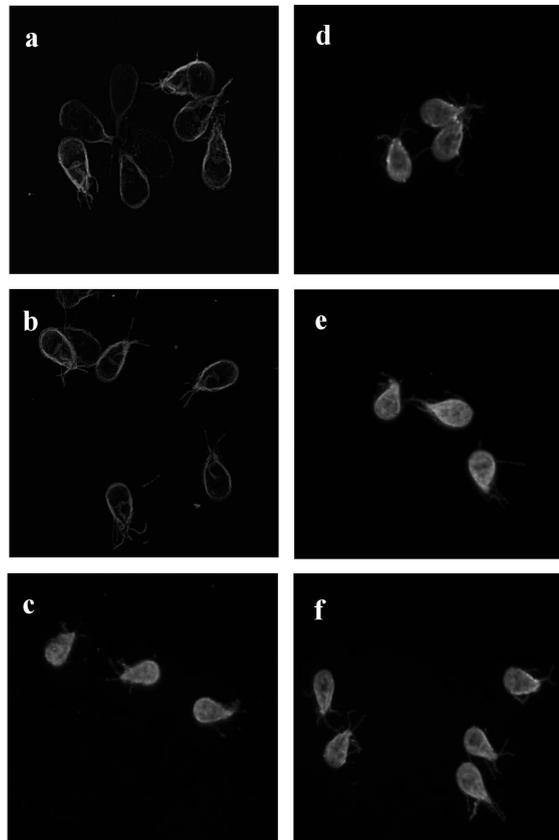


Figura 11

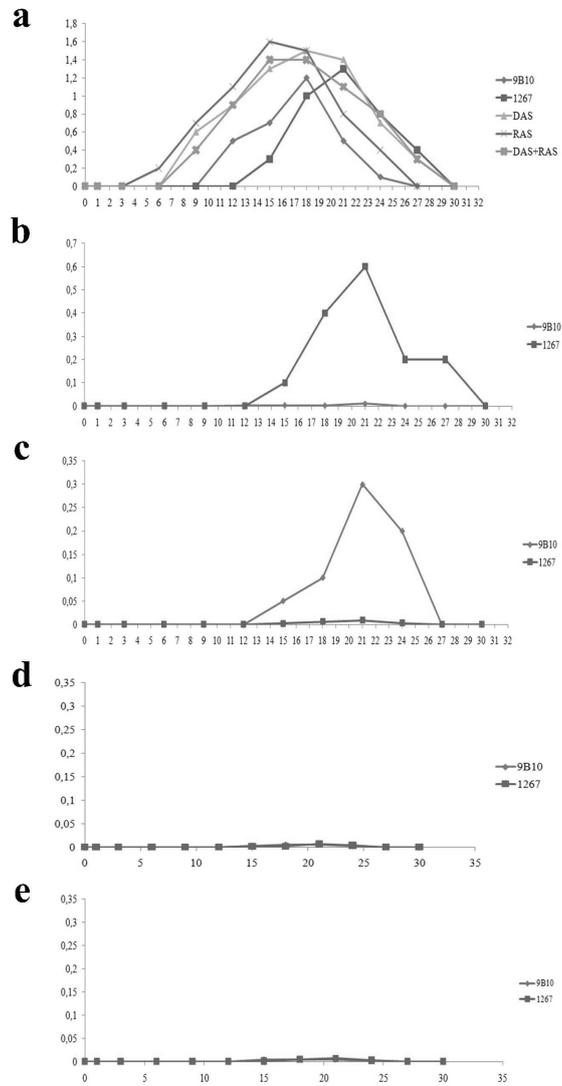


Figura 12

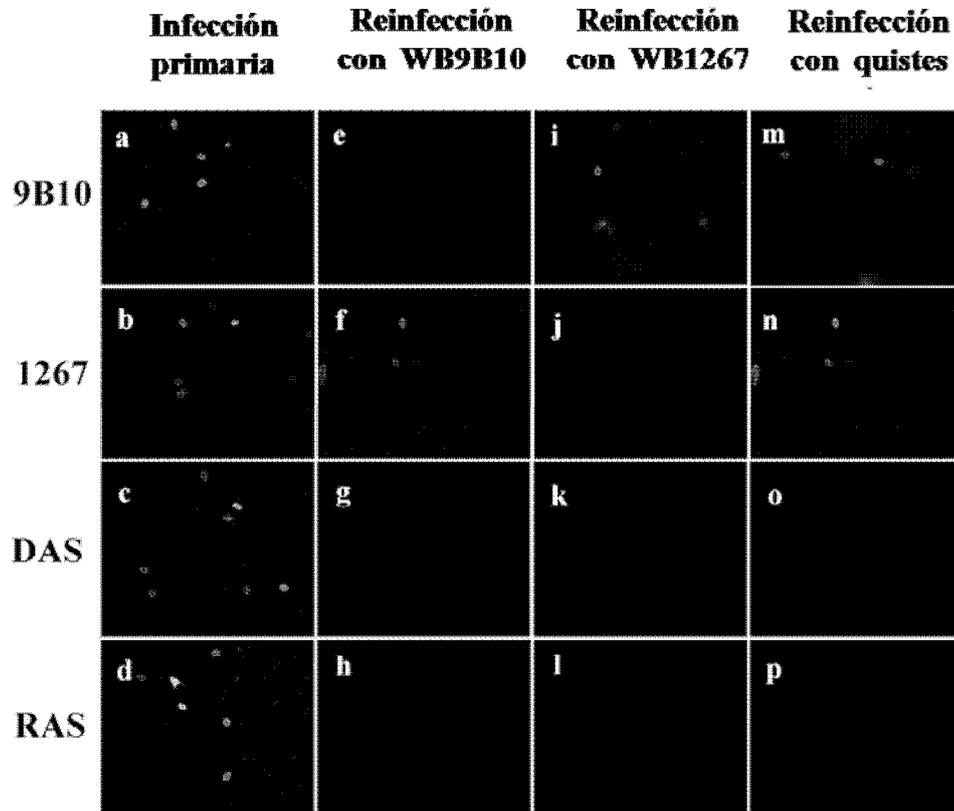


Figura 13

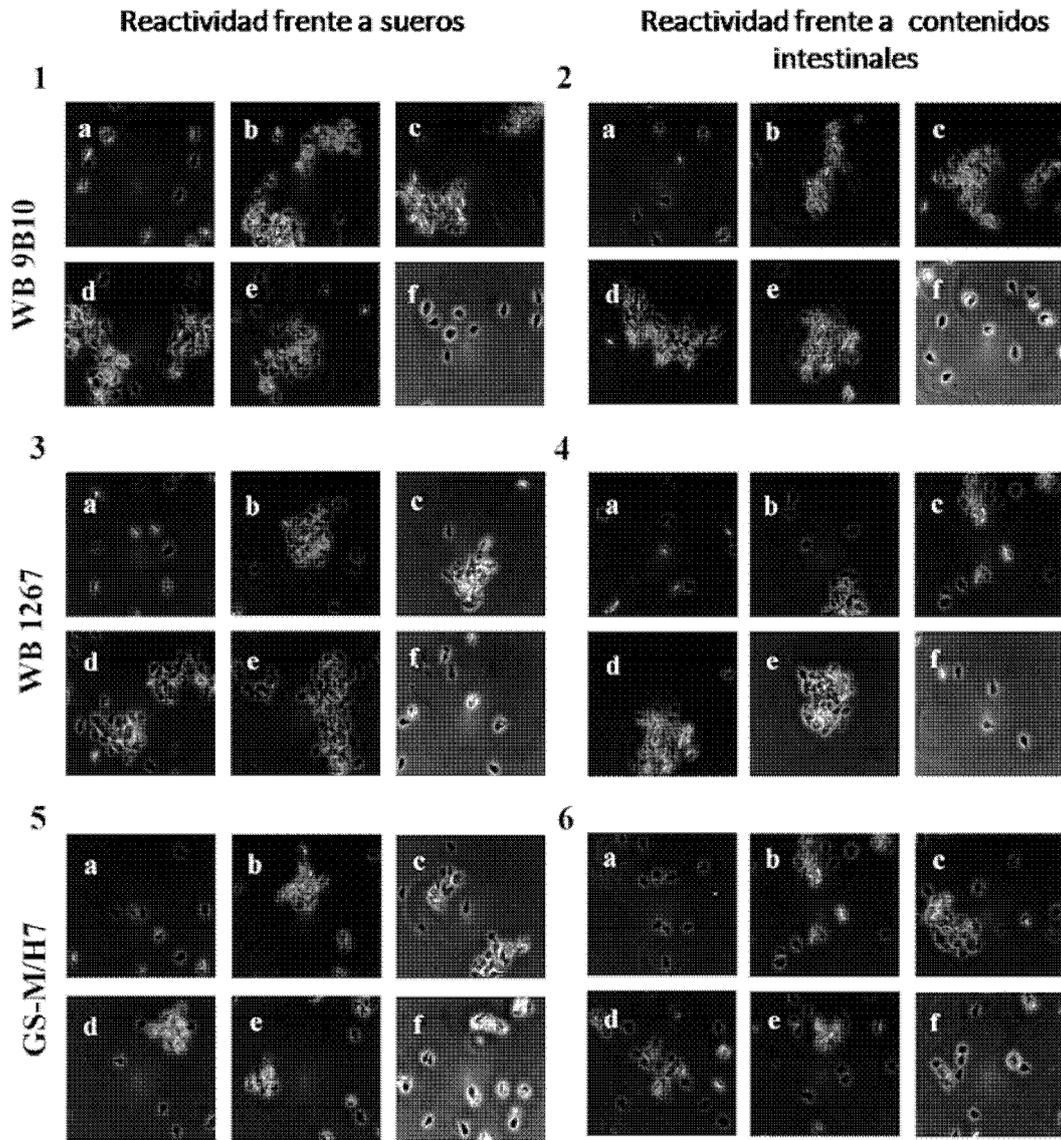


Figura 14

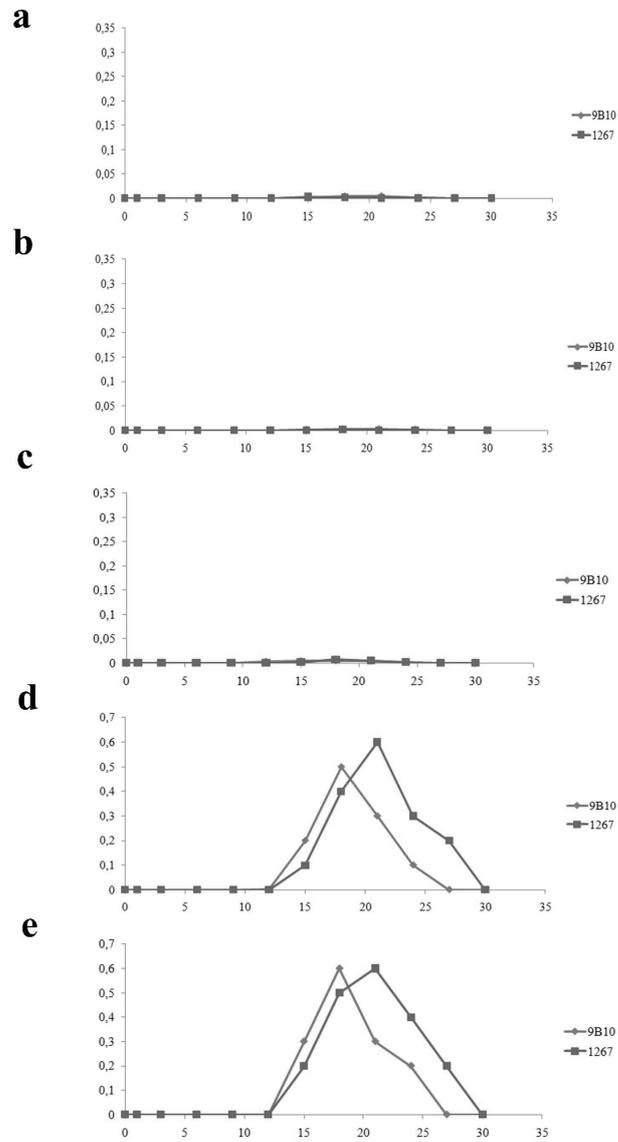


Figura 15

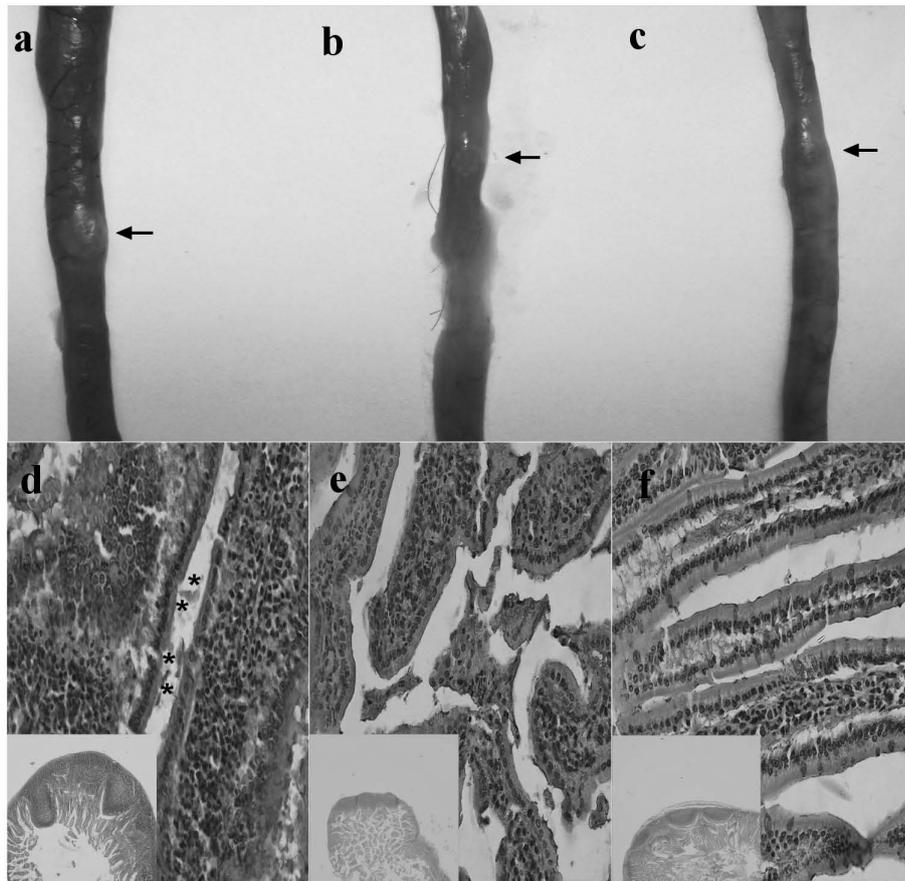


Figura 16