

REPUBLICA D
SUPERINTENDENCIA DE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854-00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04
Tra: 11 PATENTEIYI
Act. 411 PRESENTACION

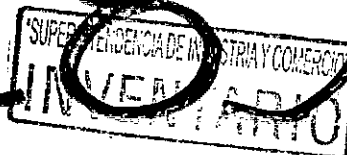
Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 257

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

PCT - FASE NACIONAL

11-82854



TÍTULO

PROTOZOO MODIFICADO QUE EXPRESA AL MENOS DOS PROTEÍNAS VARIABLES DE SUPERFICIE (VSP), VACUNA QUE LO COMPRENDE, PROCEDIMIENTOS, USOS Y MÉTODOS

SOLICITANTES

- CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET); y
- UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA.

DOMICILIO

ARGENTINA

APODERADO

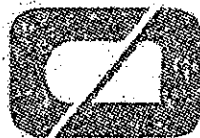
JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO

SOLICITUD INTL

PCT/IB2009/055470

FECHA

01 de julio de 2011

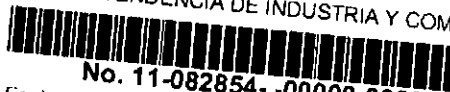


CUESTA & ASOCIADOS S.R.L.
Ingeniería y Tecnología

1
Pda, 6
02-07-2011

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854-00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 257

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①



Patente de Invención

SOLICITUD DE:



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II

○

2

SOLICITANTE

(71)

Nombre:

CONSEJO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y
TECNICAS (CONICET); y
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA.

Dirección:

Av. Rivadavia 1906 3 "F", Buenos Aires,
C1033AAJ (AR)
Obispo Trejo 323, Córdoba, X5000IYG (AR)

Nacionalidad o Domicilio: ARGENTINA

Lugar de Constitución: ARGENTINA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre

JUAN CARLOS CUESTA Q.

Dirección

CALLE 72 No. 10-07 Of. 603

Teléfono:

2113097 Fax: 2554538

E-mail:

contacto@cuestalawyers.com

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Número

79.339.809 TP 43273

④

INVENTOR (ES)

(72)

1) LUJAN, Hugo Daniel;

Dirección: Jacinto Ríos 571, Cordoba, X5004ASK, ARGENTINA

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/IB2009/055470

Fecha

02/12/2009

Publicación Internacional No.

WO/2010/064204 A2

Fecha

10/06/2010

⑥

TITULO (54)

PROTOZOO MODIFICADO QUE EXPRESA AL MENOS DOS PROTEÍNAS

VARIABLES DE SUPERFICIE (VSP), VACUNA QUE LO COMPRENDE, PROCEDIMIENTOS,
USOS Y MÉTODOS

⑦

Clasificación Internacional (51) PATENTE DE INVENCION

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

Si



No



ESTADOS UNIDOS

02/12/2008

61/119,058

⑨

Comprobante de pago No.

11- 0043369

Fecha

05/05/2011

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

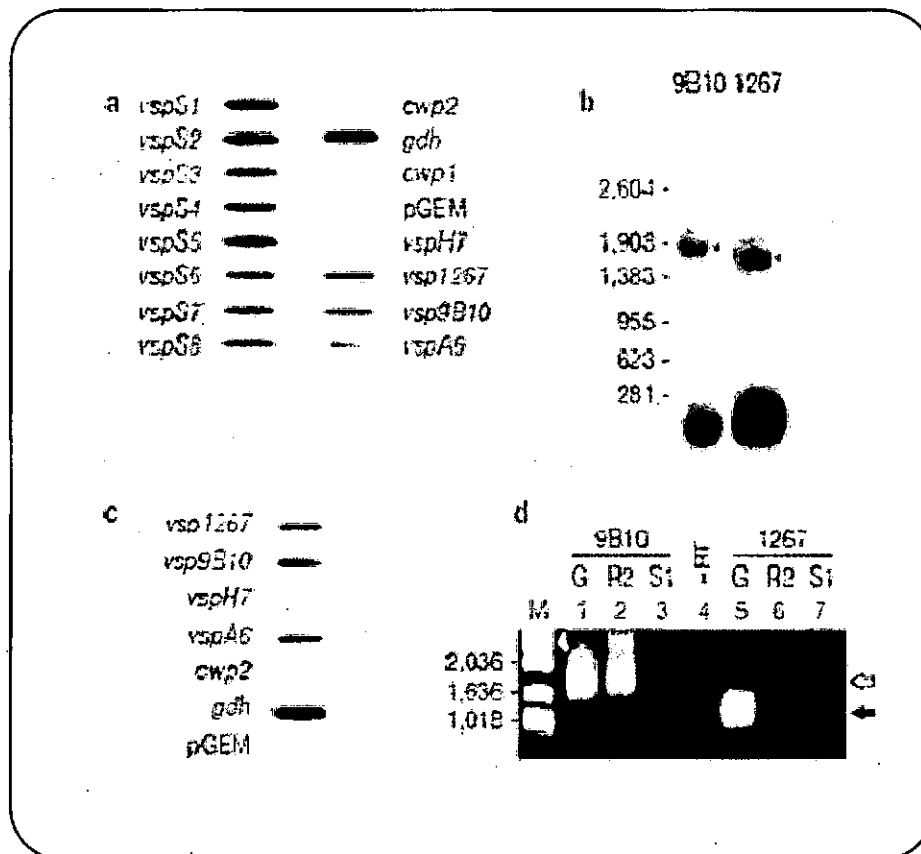
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano.
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la autoridad Internacional de Examen Preliminar
- ☐ Traducción del Examen Preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite al licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☒ De ser el caso modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO

FIRMA:

C.C. 79,339,809

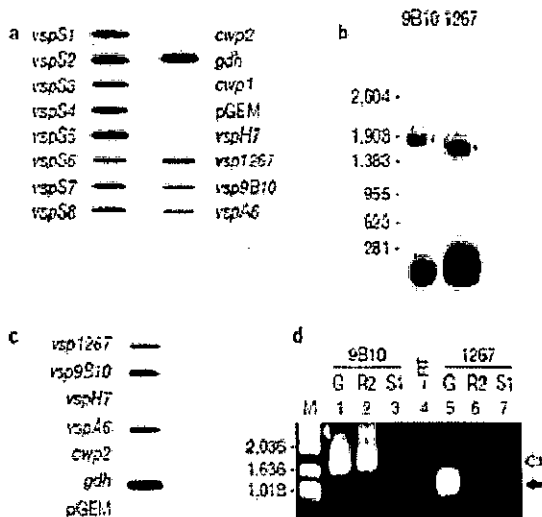
T.P. 43,273

☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☒ PCT

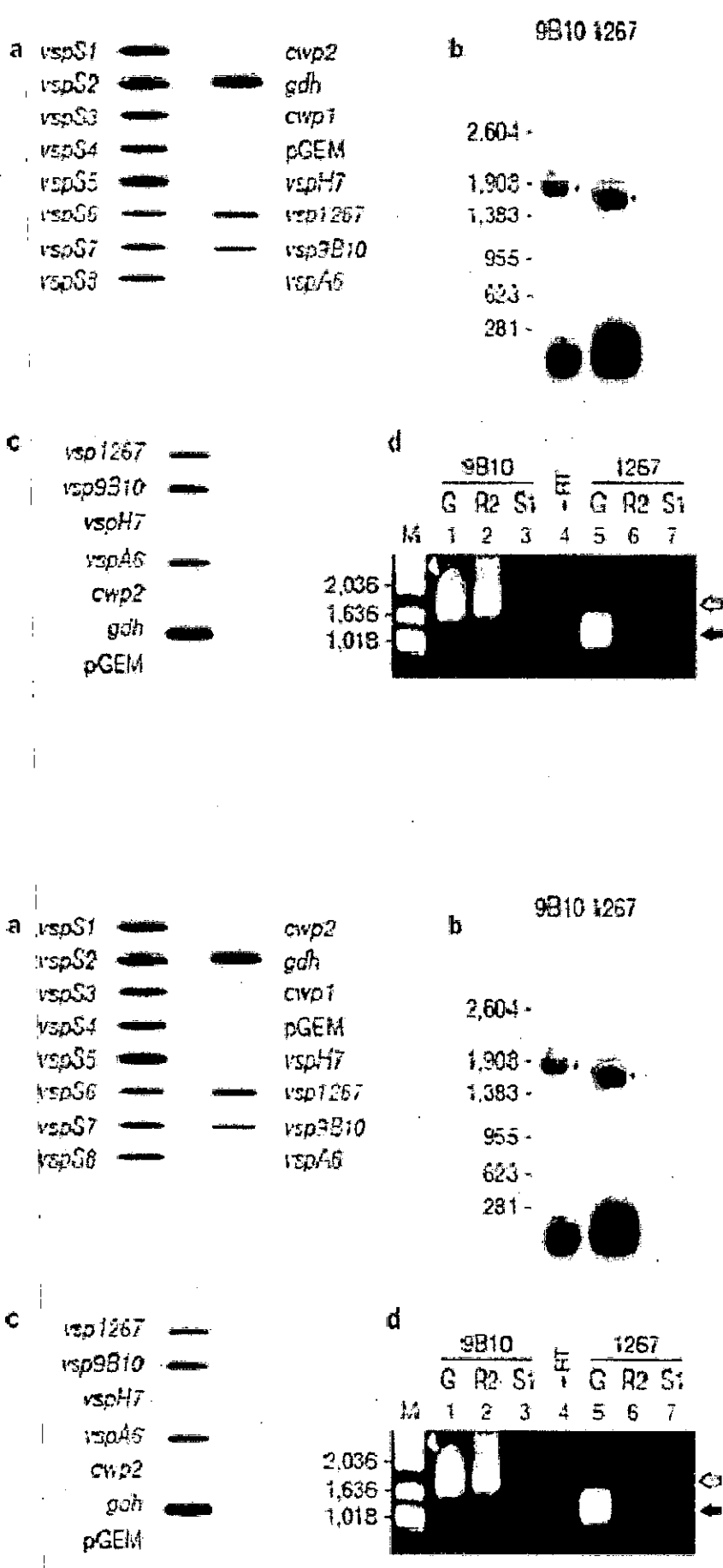
(21) No. De solicitud 11 -	(51) int. Cl:
(22) Fecha de solicitud 01 / 07 / 2011	(71) Solicitante (s) - CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET); y - UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA.
(30) Prioridad: (31) No. Prioridades: 61/119,058 (32) Fecha: 02 / 12 / 2008	(72) Interventor (es) LUJAN, Hugo Daniel; (AR).
(33) Pais: Estados Unidos (US)	(74) Apoderado (s) JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO
(54) Título PROTOZOO MODIFICADO QUE EXPRESA AL MENOS DOS PROTEÍNAS VARIABLES DE SUPERFICIE (VSP), VACUNA QUE LO COMPRENDE, PROCEDIMIENTOS, USOS Y MÉTODOS	
<i>Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT</i>	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional 02/ 07 / 2011 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud Fecha: 02/12/2009 No. de solicitud PCT: PCT/IB2009/055470	(87) Publicación internacional Fecha Fecha (10/06/2010) No. Publicación WO 2010/064204 A2

Resumen reivindicación (es):

Protozoos parásitos modificados que comprenden la expresión simultánea en su superficie de al menos dos proteínas variables de superficie (VSP). Los protozoos modificados pueden también expresar en forma simultánea el repertorio completo de proteínas variables 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. El protozoo puede ser cualquier protozoo que presente un mecanismo de variación antigénica.



ARTES FINALES 12 X 12



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0051491

Bogotá D.C., Mayo 27 de 2011 - 16:19:26

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	413588420	27/05/2011	7.371.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	91.000.00	91.000.00
				\$91.000.00

SON: **NOVENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Resibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854- -00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04 Dep. 2020 DIR. ... VASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 257

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 27 de 2011 - 16:19:27

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0043378

Bogotá D.C., Mayo 05 de 2011 - 16:54:46

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415018844	05/05/2011	8.470.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	16.000.00	16.000.00
				\$16.000.00

=====

SON: **DIECISEIS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854- -00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 257

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0043375

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Mayo 05 de 2011 - 16:54:46

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415018844	05/05/2011	8.470.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00	20.000.00
				<u>\$20.000.00</u>

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-082854-00000-0000
 Fecha: 2011-07-01 17:21:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 257

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 5 de 2011 - 16:54:48

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0043376

Bogotá D.C., Mayo 05 de 2011 - 16:54:46

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415018844	05/05/2011	8.470.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00	20.000.00
				\$20.000.00

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854-00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 257

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0043377

Bogotá D.C., Mayo 05 de 2011 - 16:54:46

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415018844	05/05/2011	8.470.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00	20.000.00
				\$20.000.00

=====

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854- -00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04

Tra. 11 PATENTE IYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR

Eve: 378 FASE NACIONAL I

Folios: 257

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 5 de 2011 - 16:54:48

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0043372

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Mayo 05 de 2011 - 16:54:46

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415018844	05/05/2011	8.470.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1.50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00	20.000.00
				\$20.000.00

=====

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854-00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 257

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 5 de 2011 - 16:54:46

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0043373

Bogotá D.C., Mayo 05 de 2011 - 16:54:46

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415018844	05/05/2011	8.470.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00	20.000.00
				\$20.000.00
			=====	

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-082854-00000-0000
Fecha: 2011-07-01 17:21:04
Tra: 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep: 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 257

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 5 de 2011 - 16:54:48

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0043374

Bogotá D.C., Mayo 05 de 2011 - 16:54:46

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415018844	05/05/2011	8.470.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00	20.000.00
				\$20.000.00

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854- -00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 257

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 5 de 2011 - 16:54:48

12

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0043370

Bogotá D.C., Mayo 05 de 2011 - 16:54:46

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415018844	05/05/2011	8.470.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00	20.000.00
				\$20.000.00

=====

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854- -00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 257

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 5 de 2011 - 16:54:46

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0043371

Bogotá D.C., Mayo 05 de 2011 - 16:54:46

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415018844	05/05/2011	8.470.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00	20.000.00
				\$20.000.00

=====

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854- 00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 257

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0043369

Bogotá D.C., Mayo 05 de 2011 - 16:54:46

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415018844	05/05/2011	8.470.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-04 PRESENTACION DE OBSERVACIONES A SOLICITUDES	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	304.000.00	304.000.00
				\$304.000.00

SON: **TRESCIENTOS CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854--00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04
Tra: 11 PATENTE IYII
Act: 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 257

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Mayo 5 de 2011 - 16:54:47

SUPERINTENDENCIA DE IND

NIT : 800.176.

-/-

REIVINDICACIONES

RECIBO
30 REIUIIndustria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

1 - 0063606

Junio 30 de 2011 - 15:08:14

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	352465890	30/06/2011	4.935.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNITARIO	Vr. CONCEPTO
30 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	810.000.00
			\$810.000.00

SON: **OCHOCIENTOS DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854-00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04
Tra. 11- PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 257

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 30 de 2011 - 15:08:14

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

La presente invención se refiere a protozoos modificados que expresa más de una proteína variables de superficie (VSP), vacuna que lo comprende, línea de hibridoma, anticuerpo monoclonal que reconoce las proteínas, procedimientos, usos y métodos. Más específicamente se refiere a protozoos parásitos modificados que comprenden la expresión simultánea en su superficie de más de una proteína variables de superficie (VSP). Los protozoos modificados pueden también expresar en forma simultánea el repertorio completo de proteínas variables 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. El protozoo puede ser cualquier protozoo que presente un mecanismo de variación antigénica y moléculas que regulan este mecanismo puedan ser silenciadas en su expresión.

ANTECEDENTES

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. & Wellems, 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

17

(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 trofozoito 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)).

Las VSPs recubren la superficie completa de los trofozoitos 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. et al. Science 317, 1921-1926 (2007)), pero solamente una VSP se expresa en un momento dado en la superficie de cada trofozoito. 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).

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Se presentan protozoos parásitos modificados que comprende la expresión simultánea en su superficie de más de una proteína variables de superficie (VSP). En una realización preferida los protozoos comprenden la expresión simultánea en su superficie del repertorio completo de proteínas variables de superficie. 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. El protozoo puede ser cualquier protozoo que presente un mecanismo de variación antigénica y que su mecanismo de variación antigénica puede ser desregulado mediante el silenciamiento de alguno de sus componentes.

Se presenta una vacuna contra infecciones producidas por protozoos que comprende al menos protozoos modificados que expresan en su superficie al menos dos proteínas variables de superficie (VSP). En una realización preferida los protozoos comprenden la expresión simultánea en su superficie del repertorio completo de proteínas variables de superficie. 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. El protozoo puede ser cualquier protozoo que presente un mecanismo de variación antigénica. La vacuna puede además comprender excipientes y/o adyuvantes.

Se presenta un procedimiento para purificar el repertorio total de proteínas de superficie variable (VSP) de protozoos que comprende:

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

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 provee una vacuna 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 provee un método 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 provee además un método 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 provee una secuencia de nucleótidos, 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 provee el uso de al menos una secuencia 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.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

En la figura 1 se muestra que en *Giardia*, son transcriptos simultaneamente 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 presentes en todas las VSPs; c: los transcriptos sentido y antisentido (vsp9B10, vsp1267, vspA6, vspH7, cwp2 y GDH) generados *in vitro*, fueron bloteados e hibridizados 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 trofozoitos 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 reaccion 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.

21

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 una 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 en 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)

22

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 transcriptos antisentido de los genes de VSP.

La figura 3 muestra a: inmunolocalización de la versión de gRdRP etiquetada con un epítopo 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 epítopo 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 epítopo 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).

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 (carril 1), sólo la hebra de ARN sentido (carril 2) o sólo la antisentido (carril 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 carriles 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 $0.1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ de hexoquinasa (carril 3). Regeneración de ATP utilizando fosfocreatina (CP, carril 4), creatina quinasa (CK, carril 5), o ambos (carril 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.

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 una transcripto estaba presente, los marcadores de tamaño de ARN en nucleotidos están a la izquierda.

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

22

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;

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.

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 cwpl 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 períodos 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

26

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 la transcriptos radiomarcados están completamente degradados;

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 hibridizaron 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 trofozoitos 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 trofozoitos salvajes y transgénicos, y desafiados con WB9B10 y WB1267. (a) Jerbos inicialmente infectados con poblaciones clonales de trofozoitos WB9B10, WB1267, o transgénicos que fueron silenciados para la expresión de Dicer (DAS) o RdRP (RAS) y

28

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 trofozoitos que expresan una VSP particular a continuación de la infección primaria con trofozoitos 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 jerbo 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 trofozoitos transgénicos que expresan el repertorio total de VSPs son capaces de aglutinar *in vitro* diferentes clones de *Giardia*. Se muestran imágenes representativas de una microscopia 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 animals infectados con clones WB1267. Suero o contenido intestinal de animals 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 animals no infectados (1a, 2a, 3a, 4a, 5a, y 6a), suero de animals infectados con DAS nockeado (1d, 2d, 3d, 4d, 5d, y 6d), y suero de animales

29

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 trofozoitos 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 trofozoitos WB9B10 o WB1267, las inmunizaciones se llevaron a cabo usando VSPs purificados de trofozoitos 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 jerbo durante la infección primaria con trofozoitos 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 el desafío de los jerbos inmunizados con VSPs purificadas de trofozoitos 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

3

infiltrante moderada en la mucosa y submucosa. Se visualizaron algunos trofozoitos 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 trofozoito 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 trofozoito, parásito, célula de parásito o protozoo tienen el mismo significado y son intercambiables

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

En la presente solicitud los trofozoitos 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

31

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 transcriptos 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.

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 trofozoitos 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*.

La disrupción de los mecanismos de variación antigenica para generar células que expresan el repertorio completo de proteínas variables de superficie en organismos patógenos no ha sido descripta aun. La expresión del repertorio completo de proteínas de superficie en organismos patógenos para generar parásitos que puedan ser

32

utilizadas como vacunas, o la purificación del repertorio completo de proteínas variables de superficie para la inmunoprolifaxis de enfermedades causadas por estos patógenos no ha sido posible hasta el momento.

Transcripción de VSP en *Giardia*:

La transcripción de genes de VSP fue analizada por ensayos de nuclear run on usando ARN aislado de nucleos pertenecientes a trofozoitos del clon WB9B10 (Fig. 1a), dicho clon expresa solamente VSP9B10 (número de acceso GenBank AAK97086) en su superficie. Los resultados indican que la mayoría los genes que codifican para VSPs fueron simultáneamente transcriptos. 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 que más de un VSP es transcripto en el núcleo del parásito.

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

Un paso clave en el PTGS es la producción de ARNdc que son homologos 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 trofozoitos (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.

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.

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

37

lado citoplasmático del retículo endoplásmico. Más aun, la enzima está activa en los trofozoitos, debido a que es capaz de formar ARN de alto peso molecular *in vitro* en presencia de ARN homologos 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 vivo* de la Dicer recombinante (Macrae, I. J. et al. Science 311, 195-198 (2006)).

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 otras los componentes de RISC y con ARN, respectivamente.

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 hébra 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

35

siARN indicó que derivaban de los genes de VSP cargados y que poseen una longitud de 22-25 nucleótidos (Tabla 1).

Tabla 1:

VSP9B10 sense small RNAs	VSP9B10 antisense small RNAs
GTTTTGTTCTCGCGGGGTACTCGT (SEQ ID N° 1)	ACCCCCGCGAGAACAAAAGTACC (SEQ ID N° 57)
AGAGCGCGCGGCTCAATGCGCAG (SEQ ID N° 2)	TCCTGCCCATGCAATCTGGACGA (SEQ ID N° 58)
GATTGCATGGGCAGGAAAAGCAA (SEQ ID N° 3)	ATTGAGCCGCGCGCTCTGTTGCTTT (SEQ ID N° 59)
TCTCGATGTAACACAGGATTGT (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)	CCCGGCGGCACGAAGTATCCTTG (SEQ ID N° 66)
ACCAATCGGTCATACCATGCGGAG (SEQ ID N° 11)	ACCGATTGGTGAGAGGCGTCTGC (SEQ ID N° 67)
ACGATAAAAAGTACAAGGGCGTGCT (SEQ ID N° 12)	ACTTTTTATCGTTCTTAAGTGTTA (SEQ ID N° 68)
ACCGGCACCAAGACGTGCAAGAC (SEQ ID N° 13)	TGTGGGAGCGTAACACCGAGTGC (SEQ ID N° 69)
TGCGACGTGCGAGAAGGGCGCCGA (SEQ ID N° 14)	CACGCAGTACACGTGGCGGCCTT (SEQ ID N° 70)
GCCCCACCCNNAGTGCAACACCCCC (SEQ ID N° 15)	CACGCAGGAGGTGGCTGAGTCCT (SEQ ID N° 71)
GCTGCAAGACGTGCAGTGAGCCGA (SEQ ID N° 16)	GTGCCGGTGCACTCTTCTTCTGT (SEQ ID N° 72)
AGACAAGCAAGGAGGTGTGCNCA (SEQ ID N° 17)	TTGTTTGGCTGGACCTTCTTATT (SEQ ID N° 73)
ACGGTTGTGAGCACCTGGAAGGC (SEQ ID N° 18)	GCACTACCGTCTCCGGGCACTTT (SEQ ID N° 74)
CCTGTGCCAAGTGCAATACCTCG (SEQ ID N° 19)	GCTTCTTCGTGCACCCGGTGCCC (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)	TAGCAGCCCCCGTTTCATGCGGAA (SEQ ID N° 79)

30

ID N° 23)	ID N° 79)
GATGTAAGACGTGCACCAGCCAG (SEQ ID N° 24)	ACCTCCTCACAGACGCTCTTTCCA (SEQ ID N° 80)
TACTACCTGTCCAAAGAAAAGTG (SEQ ID N° 25)	GCTTGTATCCGTCGGCCGGAGTC (SEQ ID N° 81)
CCCCCAACCAACAATAAAGGGCC (SEQ ID N° 26)	CACTCGGAGCACCCAGTGCGCA (SEQ ID N° 82)
ACCTCATACAGAACANNAACAGG (SEQ ID N° 27)	CACTTGGTGGCGTCGTCCGCATTG (SEQ ID N° 83)
GGGATCTCCGTCGCTGTCATCGC (SEQ ID N° 28)	ACAGCGNCGGAGATCCCCGCTATGG (SEQ ID N° 84)
TGCTGGTGGTTCATATGTAGNGG (SEQ ID N° 29)	AGAGGAAGCCCACGAGGCCCCC (SEQ ID N° 85)

VSP1267 sense small RNAs	VSP1267 antisense small RNAs
GCAAGCACTCTTGCAGGAGCTT (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)
GCGGCTGATACCACGGATTCCTGT (SEQ ID N° 36)	GCGTNATCATTAGGGAAATATCC (SEQ ID N° 93)
CAACTGGGGTCACGATTGGTGAG (SEQ ID N° 37)	TTAAGGGNNCTCAGGCTATTCGTG (SEQ ID N° 94)
ACTAATTGCGTTNNGTGTACCAA (SEQ ID N° 38)	TCAGGACAGACCCNGGGTAGCAG (SEQ ID N° 95)
GAGTGTGCTTCCAATCTGTATCTG (SEQ ID N° 39)	CGTCGGCGCAGTTTCCAAATAC (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)	
GTATCGCAGAGTGACGGGAANG (SEQ ID N° 44)	
GGCAGTGACAGCTAGCATAGCAG (SEQ ID N° 45)	
CCTTTGCGTGTGCGCCGAAACAG (SEQ ID N° 46)	
TAAAACCAACGGAGTTTGCACTGCC (SEQ ID N° 47)	
CTATCAGGCTGAGAAGTTTCCTG (SEQ ID N° 48)	

N° 48)	
GCAGGAAAGTGCACGACCTGTGCG (SEQ ID N° 49)	

VSPH7 sense small RNAs	VSPH7 antisense small RNAs
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)	CTTCCGTCTTNNAATAATCCTACC (SEQ ID N° 102)
ACAAAGGGAACATGCATTGCAGA (SEQ ID N° 53)	GAATCGTAACCCCGGTTGCGTCG (SEQ ID N° 103)
ACGCCGGATAANACCAACGGAGTT (SEQ ID N° 54)	ACTTAGCACAACCGGCCACACCC (SEQ ID N° 104)
TGTGCAANNGATAACACTAANA (SEQ ID N° 55)	CTTATCAGCCGTACTACAGGTAAG (SEQ ID N° 105)
CTCGTCGGCTTCCTCTGCTGGTG (SEQ ID N° 56)	ACGGTGCTAGCCCTAGTTGTAGA (SEQ ID N° 106)
	CGTTCTTCAAGNNCTCAGATTGTT (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)

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 haemagglutinina. *Giardia* AGO se localiza en el citoplasma.

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,

2

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*.

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 transcriptos 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 transcripto 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 interferieron 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

2,9

buscaron pequeños ARNs resultantes de la degradación ARNdc de VSP.

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 pudo 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.

Para probar si la concentración de los diferentes transcriptos de VSP tiene un rol en el cambio antigénico, se des-balanceó 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. et al. 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*.

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

48

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*:

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 trofozoitos 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 trofozoitos de la invención en los cuáles Dicer o RdRP fueron noqueado no disminuyen su proliferación y se enquistan normalmente, no se observó efecto nocivo alguno sobre la regulación de VSP cuando se aplicó el procedimineto 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*, ó cualquier otro protozoo que presente un mecanismo de variación antigénica, estando todos ellos dentro del alcance de la presente invención.

46

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

La tabla muestra los porcentaje de trofozoitos 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 trofozoitos de WB9B10 tranfectados con constructos antisentidos de genes de *Giardias* que codifican para RdRP y Dicer, como el plásmido vacío solo (simulado) o no tranfectado (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 trofozoito.

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

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 trofozoitos de modificados, mientras que el anticuerpo monoclonal 12F1 de la invención reacciona con muchas especies proteicas en los trofozoitos modificados, indicando que muchas VSPs se pueden expresan

42

en forma simultánea en las *Giardia* cuando el camino de ARNi se ha interrumpido o silenciado.

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 viaribilidad antigénica, por ejemplo *Plasmodium* ó *Trypanosoma*.

Es evidente que independientemente del procedimiento de silenciamiento utilizado cualquier protozoo modificado de manera tal que exprese el repertorio completo de proteínas de superficie se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

Así mismo se encuentra dentro del alcance de la presente invención cualquier procedimiento de silenciamiento de RdRP y/o Dicer en protozoos.

43

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 jerbo. 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)

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

Estos porcentajes demuestran que las células expresan simultáneamente una gran cantidad de VSPs en su superficie (> 100%). Estos trofozoítos modificados crecen y se

99

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 tal de asegurar 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 Immunofluorescencia 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 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

44

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 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 trofozoitos del clon WB9B10 y porcentaje de jerbos infectados (entre paréntesis).

Infección primaria con	Cantida d 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 trofozoitos del clon WB1267 y porcentaje de jerbos infectados (entre paréntesis).

Infección primaria con	Cantida d de jerbos	MNZ	Desafío al mes 2 (% de infección)	Desafío al mes 4 (% de infección)	Desafío al mes 12 (% de infección)
------------------------	---------------------	-----	-----------------------------------	-----------------------------------	------------------------------------

4X

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 trofozoitos que expresan VSP1267 (se detectó una elevada cantidad de quistes). Los jerbos previamente infectados con trofozoitos DAS o RAS fueron protegidos frente a infecciones subsecuentes con clones WB9B10 o WB1267 (no se encontraron quistes en las muestras de heces).

40

Para determinar si los quistes obtenidos en las infecciones originales (para los cuales la VSP de los trofozoitos 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 trofozoitos 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%)

49

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

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 immune 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 descriptos más arriba. La protección generada por la preparación del todo el

56

repertorio de VSPs se mantuvo durante al menos un año (Tablas 7, 8 y 9).

Tabla 7: Desafío con trofozoitos 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 trofozoitos del clon WB1267 y porcentaje de jerbos infectados (entre paréntesis) luego de la inmunización con VSPs purificadas.

Inmunización con VSPs o	Cantidad de	MNZ	Desafío al mes 2	Desafío al mes 4	Desafío al mes 12
-------------------------	-------------	-----	------------------	------------------	-------------------

57

Bip	jerbos		(% de infección)	(% de infección)	(% 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

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).

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.

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

Los protozoos modificados y las vacunas de la invención incrementan la inmunidad de cualquier mamífero

54

contra infecciones producidas por protozoos que muestran mecanismos de variación antigénica para superar la respuesta inmune del huésped. Es evidente que los parásitos pueden ser de cualquier tipo de protozoario que muestre dicho mecanismo, por ejemplo Plasmodium, Trypanosoma, Babesia, etc.,

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.

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

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.

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

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

Los jerbos inmunizados con trofozoitos de *Giardia* muertos que expresan todo el repertorio de VSPs, por ejemplo por silenciamiento de Dicer y/o RdRP, están

5

protegidos contra una posterior infección de las diferentes poblaciones clonales.

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.

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.

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. Por el contrario, debe entenderse claramente que puede recurrirse a otras realizaciones, modificaciones y equivalentes de la misma que luego de leerse la presente descripción, puede sugerir a aquellos entendidos en el tema sin apartarse del espíritu de la presente invención y/o alcance de las reivindicaciones anexas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cultivo y clonado del parásito: Se cultivaron trofozoitos 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 trofozoitos 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).

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 quinaasa T4 utilizando □-[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).

Análisis de las corridas nucleares: Se resuspendieron 10^7 - 10^8 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-

58

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 transcriptos 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 de 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 electroblotado 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 hibridzó 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 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

SM

provinieron de una fuente comercial (Decade TM 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 transcriptos 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. Transcriptos 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 se 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. CompleteTM), 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, mpleado com 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

60

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 trofozoitos 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 λ gt22a como se reporto en (Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. *Genes Dev* 15, 188-200 (2001)). La revisión de la biblioteca λ ZAP gDNA se realizó como describe (Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. *Genes*

61

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 trofozoitos transfectados por afinidad utilizando antiHA-sefaroza (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 codon 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 trofozoitos de *G. lamblia* fue realizada por electroporación como ya se ha

descripto (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 trofozoitos 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 trofozoitos 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 Aplanachromat). 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 trofozoitos transfectados comparados con la 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 trofozoitos 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 trofozoitos no enquistados y enquistados (Jambhekar, A. D. et al. 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 trofozoitos 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

64

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 96 pozos (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

65

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 descripto más arriba.

Transfección de Giardia lamblia: La transfección de *Giardia* se llevó a cabo por electroporación esencialmente

66

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 10-15µg del plásmido fueron añadidos a un volumen final de 100 µl. La mezcla se incubó durante 10 minutos en hielo. Las células fueron electroporadas a 350V, 1000µF y 700Ω 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-

67

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-inmunoglobulina 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 Apochromat). 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.

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.

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**,

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 los antígenos o proteínas de *Giardia* por ELISA utilizando un preparado de proteínas totales extraídos de trofozoitos 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

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 puedan ingerir durante todo el tratamiento (los animales ingieren esta solución diluida 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.

3. *Infecciones*: Las infecciones fueron inducidas en los Jerbos por inoculación orogástrica de 2×10^5 trofozoitos 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 trofozoitos se identificaron visualmente por microscopía o por ensayos de

9

inmunofluorescencia utilizando antígenos específicos del quiste (Mab 7D2) o del trofozoito (BIP; Mab 9C9).

4. Periódicamente, los jerbos seleccionados al azar fueron sacrificados y el intestino delgado fue aislado, se abrió una rendija longitudinalmente y se suspendió 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)).

Los quistes *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). 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.

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 (GE). El Mab purificado se unió a esferas magnéticas (Dynal) y las esferas se utilizaron para purificar las VSPs de los

71

trofozoítos tratados con buffer RIPA. 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 epítotope señalado con Hemaglutinina (HA-BIP). Los trofozoítos transgénicos fueron lisados con el buffer RIPA y la proteína BIP aislada utilizando el Kit de immunopurification 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.

22

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 celdas 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 for 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 union de los anticuerpos a la superficie del parásito se demostró con inmunoglobulinas de cabra anti ratón marcadas con TRITC.

35

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	
gttttgttct cgcgggggta ctcgt	25
<210> 2	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Giardia intestinalis	
<400> 2	
agagcgcgcg gctcaatgcg cag	23

24

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

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 4
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
<400> 5
ggacaatgtg cagacnnaga agg 23

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

<210> 7
<211> 24

5

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

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 8
ctttcatgta caaggcggcg 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
<400> 9
cgaagcanc cagcagcccg gacag 25

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

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 11

36

accaatcggg cataccatgc ggag 24

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 12

acgataaaaa gtacaagggc gtgct 25

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 13

accggcacca agacgtgcaa gac 23

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 14

tgcgacgtgc gagaaggcg 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

gccccgaccn nagtgcaaca ccccc 25

<210> 16

<211> 24

77

<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 16
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
agacaagcaa ggaggtgtgc nca 23

<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 18
acggttgtga gcacctggaa ggc 23

<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 19
cctgtgccaa gtgcaatacc tcg 23

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 20
agctacgaag gagagggcac gggg 24

<210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis

<400> 21
 tcggcccgca cagcctcctg ccag 24

<210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 22
 acgaaacgac caanctccct ggaa 24

<210> 23
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 23
 tgaataatgg cgcgctcatc acttg 25

<210> 24
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 24
 gatgtaagac gtgcaccagc cag 23

<210> 25
 <211> 23

201

<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 25
tactacctgt ccaaagaaa gtg 23

<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 26
cccccaacca acaataaagg gcc 23

<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
acctcatata gaacannaac agg 23

<210> 28
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 28
gggatctccg tcgctgtcat cgc 23

<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
tgctggtggt tcatatgtag ngg 23

<210> 30
<211> 22
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 30
gcaagcactc ttgcaggagc tt 22

<210> 31
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 31
gctctacgac tcaggctaatt tgt 23

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 32
caacgggggtg tgtgaagcag ccgc 24

<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 33
gtaagaagtg ccttctgcaa acc 23

<210> 34

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 34
 caaaccttca tgttcaaggg cgg 23

<210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 35
 tgatgctgcc tctggtacta ctgg 24

<210> 36
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 36
 gcggctgata ccacggattc ctgt 24

<210> 37
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 37
 caactgggggt cacgattggt gag 23

<210> 38
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> n is a, c, g, or t

102

<400> 38
 actaattgcg ttngtgtac caaa 24

<210> 39
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 39
 gagtgtgctt ccaatctgta tctg 24

<210> 40
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 40
 gaaacttgca agacaggata ttcc 25

<210> 41
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 41
 ttccntaat gataacgctg ata 23

<210> 42
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 42
 ccggtgctat tcttatcacc tgca 24

<210> 43

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 43
 gcaaggacga caacactgcg gcc 23

<210> 44
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 44
 gtatcgaga gtgcacggga ang 23

<210> 45
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 45
 ggcaagtgcac agctagcata gcag 24

<210> 46
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 46
 cctttgcgtg tcggccgaaa cag 23

<210> 47
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis

89

<400> 47
taaaaccaac ggagtttgca ctgcc 25

<210> 48
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 48
ctatcaggct gagaagttc ctg 23

<210> 49
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 49
gcaggaaagt gcacgacctg tgcg 24

<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 50
ggaaaccttg gtaggattat ttgc 24

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis

<400> 51
aatgctaate tgtacctgaa ggct 24

<210> 52
<211> 23
<212> DNA

<213> Giardia intestinalis
 <400> 52
 ggcatagatg ggtgctctgc atg 23

<210> 53
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 53
 acaaagggaa 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
 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
 tgtgcaanng ataacactaa na 22

<210> 56
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 56
 ctctcggtct tctctgctg gtg 23

<210> 57
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 57
 acccccgcca gaacaaaact gcc 23

<210> 58
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 58
 tctgccccat gcaatctgga cga 23

<210> 59
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 59
 attgagccgc gcgctctgtt gcttt 25

<210> 60
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 60
 atgcttcctc tgcgcaatta gtgt 24

<210> 61
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 61
caatacaatt taccacgat cag 23

<210> 62
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis

<400> 62
tgcacattgt ccattgatag gaa 23

<210> 63
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 63
ctgatcagct gtatcgctc cgg 23

<210> 64
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 64
gtaacagccg ccctgtaca tga 23

<210> 65
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)

<223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 65
 catctgccgc cngacanntg gtc 23

<210> 66
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 66
 cccggcggca cgaagtatcc ttg 23

<210> 67
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 67
 accgattggt gagagcgtc tgc 23

<210> 68
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 68
 actttttatc gttettaact gtta 24

<210> 69
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 69
 tgtgggagcg taacaccgag tgc 23

<210> 70
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 70
 cacgcagtac acgtggcggc ctt 23

<210> 71
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 71
 cacgcaggag gtggctgagt cct 23

<210> 72
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 72
 gtgcggtgc actcttcttc tgt 23

<210> 73
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 73
 ttgtttggct ggaccttctt att 23

<210> 74
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 74

gcactcacccg tctccgggca cttt 24

<210> 75
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 75

gcttctctgt gcacccgggtg ccc 23

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

ctgggtgccct cgtagtnncc tncc 24

<210> 77
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 77

tgaggacctg cttaggctcg cag 23

<210> 78
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 78
 cttcttgacn cacagccgt tctc 24

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

<210> 80
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 80
 acctctctac agacgtctt tcca 24

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

<210> 82
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 82
 cactcggagc acccagtggc gca 23

<210> 83
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 83
cacttggtgg cgtcgtccgc attg 24

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

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

<210> 85
<211> 22
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 85
agaggaagcc cacgaggccc cc 22

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

<210> 87
<211> 23

<212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 87
 gctattaggc aattaattaa tag 23

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

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

<210> 90
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <400> 90
 gcacttetta caagtctgat cag 23

<210> 91
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Giardia intestinalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> n is a, c, g, or t

49

<400> 91
ttaaattacc agtnnctccc gct 23

<210> 92
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 92
attactetca ccaatcgtga cccc 24

<210> 93
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 93
gcgtnatcat tagggaaata tcc 23

<210> 94
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(9)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 94
ttaaggggnc tcaggctatt cgtg 24

<210> 95
<211> 23
<212> DNA

ab

<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 95
tcaggacaga cccngggtag cag 23

<210> 96
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 96
cgtcggcgca gttttcaaa tac 23

<210> 97
<211> 25
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 97
agtgcaaact ccgttggtt tatcc 25

<210> 98
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 98
gcatcggtg tcgtgcacaa cgt 23

<210> 99
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)

25

<223> n is a, c, g, or t
<400> 99
gccgctggtc tngacgtagc agg 23

<210> 100
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 100
agtcgtagag caagctcctg caag 24

<210> 101
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 101
accccggtga tgggcacata gttt 24

<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
cttccgtett nnaaataatc ctacc 25

<210> 103
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 103
gaatcgtaac cccggttgcg tcg 23

0/7

<210> 104
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 104
acttagcaca accggccaca ccc 23

<210> 105
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis

<400> 105
cttatcagcc gtactacagg taag 24

<210> 106
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 106
acgggtgctag ccctagttgt aga 23

<210> 107
<211> 25
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 107
cgttcttcaa ggnnctcaga ttgtt 25

<210> 108
<211> 22

<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 108
ctctgcaatg catgttcct tt 22

<210> 109
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 109
cgacccgggt ggtgccgctc ttgc 24

<210> 110
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 110
ccattgctgt ctntatcttg ccc 23

<210> 111
<211> 22
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 111
gtgttatctt ngcacacgat gc 22

491

<210> 112
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 112
gacgggagta gaactctgag gaga 24

<210> 113
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador sentido S1
<400> 113
cvtgtgchrr stgcaa 16

<210> 114
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador sentido S2
<400> 114
tgcacsrset gcyabcc 17

<210> 115
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cebador sentido S3
<400> 115
tagtgydsyv mvtgyaa 17

540

<210> 116
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador sentido S4
<400> 116
cgatcatgac gggcttct 18

<210> 117
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador antisentido R1
<400> 117
ccbacgaggc cyccsacgac 20

<210> 118
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador antisentido R2

<400> 118
cgccttccek ckrcakayga 20

<210> 119
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador sentido para vsp1267
<400> 119
atgtgttga tagccttcta tc 22

107

<210> 120
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador antisentido vsp1267
<400> 120
ctacgccttc cccctgcata tg 22

<210> 121
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador hacia adelante vsp9B10
<400> 121
atgtttggca gttttgttct c 21

<210> 122
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador antisentido vsp9B10
<400> 122
tcacgccttc cctctacata tg 22

<210> 123
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador HL60 gDicer
<400> 123

102

tggcggcgctc gtatcagtta t 21

<210> 124

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cebador HL161 gDicer

<400> 124

tccccgcacg caagaagaa 19

<210> 125

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cebador HL164 gAgo

<400> 125

attgccccct acggtgtc 18

<210> 126

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cebador HL165 gAgo

<400> 126

ctctgccggc cttcctac 18

<210> 127

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cebador HL187 gRdRP

103

<400> 127
catgggttgc agtttcttga cga 23

<210> 128
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador HL188 gRdRP
<400> 128
agcccccttat ctgttgcttc cttc 24

<210> 129
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador HL 183 CWP1
<400> 129
tcgccctgga tgtttcggac a 21

<210> 130
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador HL184 CWP1
<400> 130
aggcgggtga ggcagta 17

<210> 131
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador HL185 GDH

104

<400> 131
agtggggcgg gtctttactc a 21

<210> 132
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador HL186 GDH
<400> 132
tgttcgcgcc catctggtag ttct 24

<210> 133
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador F RdRP_F
<400> 133
tatgttttta ctgatggcgc agg 23

<210> 134
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador RdRP_F 2
<400> 134
tacgtcttta ccgatggcgg agg 23

<210> 135
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cebador RdRP_R
<400> 135
tcaccatcca ggtcgctgcc 20

<210> 136
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador RdRP_R 2
<400> 136
tcaccgtcca ggtcactgcc 20

<210> 137
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador de secuenciamiento F
<400> 137
cttgtgcata gtaaacaaag 20

<210> 138
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador de secuenciamiento R
<400> 138
caaatggctg atgctggg 18

<210> 139
<211> 51
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> MCSnewSense
 <400> 139
 gattccgggc ccagatctat cgatacgcgt atgcattegc gagatatctg c 51

<210> 140
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> MCSnewAntisense
 <400> 140
 gcggccgcag atatctcgcg aatgcatacg cgtatcgata gatctgggcc cg 52

<210> 141
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> cebador DAF
 <400> 141
 agttgaaact atcatggtg ctcccga 28

<210> 142
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> cebador DAR
 <400> 142
 ccaccatggt tgaacgccga atccaac 27

<210> 143
 <211> 31
 <212> DNA

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Protozoo parásito modificado, caracterizados porque comprende la expresión simultánea en su superficie de más de una proteína variable de superficie.

2. Protozoo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende la expresión simultánea en su superficie del repertorio completo de proteínas variables de superficie.

3. Protozoo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende la expresión reducida de las enzimas seleccionadas del grupo comprendido por Dicer, ARN polimerasa RNA dependiente (RdRP) y ambas.

4. Protozoo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el gen RdRP ha sido silenciado.

5. Protozoo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el gen Dicer ha sido silenciado.

6. Protozoo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque los genes RdRP y Dicer han sido silenciados.

7. Protozoo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho protozoo comprende un mecanismo de variación antigénica.

8. Protozoo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho protozoo es seleccionado del grupo comprendido por *Giardia*, *Plasmodium*, *Babesia* y *Trypanosoma*.

9. Una vacuna contra infecciones producidas por protozoos, caracterizada porque comprende al menos protozoos modificados que expresan en su superficie al más de una proteína variable de superficie.

10. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque el protozoo expresa en su superficie el repertorio completo de proteínas variables de superficie.

11. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque el protozoo comprende la expresión reducida de las enzimas seleccionadas del grupo comprendido por Dicer, ARN polimerasa RNA dependiente (RdRP) y ambas.

12. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque el porque el gen RdRP del protozoo ha sido silenciado.

13. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque el gen Dicer del protozoo ha sido silenciado.

14. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque los genes RdRP y Dicer del protozoo han sido silenciados.

15. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque el porque dicho protozoo comprende un mecanismo de variación antigénica.

16. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque el porque dicho protozoo es seleccionado del grupo comprendido por *Giardia*, *Plasmodium*, *Babesia* y *Trypanosoma*.

17. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque comprende además excipientes y/o adyuvantes.

18. Un procedimiento para purificar el repertorio total de proteínas de superficie variable (VSP) de protozoos, caracterizado porque comprende:

a) unir un anticuerpo que reconoce la secuencia de aminoácidos CRKGA de las VSP a un soporte sólido;

b) contactar el soporte sólido con un protozoo; y

c) separar el repertorio total de proteínas de superficie variable (VSP).

19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque el protozoo es una mezcla de

110

clones de protozoos salvajes, en donde cada clon expresa una proteína de superficie variable diferente.

20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque el protozoo es un clon que expresan más de una VSP diferentes, en donde dicho clon es un clon de protozoos modificado que comprende el silenciamiento de los genes seleccionados del grupo consistente en RdRP, Dicer y ambos.

21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque el protozoo es un clon que expresan la totalidad del repertorio de VSPs, en donde dicho clon es un clon de protozoos modificado que comprende el silenciamiento de los genes seleccionados del grupo consistente en RdRP, Dicer y ambos.

22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque el protozoo es seleccionado del grupo comprendido por *Giardia*, *Plasmodium*, *Babesia* y *Trypanosoma*.

23. Una vacuna, caracterizada porque comprende más de una proteína variable de superficie de protozoos, en donde cada una de dichas proteínas es diferente; excipientes y/o adyuvantes.

24. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 23, caracterizada porque comprende el repertorio completo de proteínas variables de la superficie de protozoos, en donde cada una de dichas proteínas es diferente.

25. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 23, caracterizada porque el protozoo es seleccionado del grupo comprendido por *Giardia*, *Plasmodium*, *Babesia* y *Trypanosoma*.

26. Una vacuna, caracterizada porque comprende el repertorio completo proteínas variables de superficie (VSP), en donde dichas proteínas son obtenidas empleando el procedimiento de la reivindicación 18.

27. Un método de inmunización, caracterizado porque comprende administrar a un mamífero una cantidad de una vacuna que comprende protozoos modificados que expresan al menos dos proteínas de superficie variable (VSP).

28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, caracterizado porque el protozoo expresa el repertorio completo de VSPs.

29. El método de acuerdo con la reivindicación 27, caracterizado porque se administra en la forma seleccionada del grupo consistente en oral, subcutánea, endovenosa e intramuscular.

30. El método de acuerdo con la reivindicación 27, caracterizado porque el protozoo es un protozoo modificado que comprende el silenciamiento de los genes seleccionados del grupo consistente en RdRP, Dicer y ambos.

31. El método de acuerdo con la reivindicación 27, caracterizado porque comprende inmunizar un mamífero contra la infección de protozoarios, en donde dichos protozoarios tienen un mecanismo de variación antigénica.

32. Un método de inmunización, caracterizado porque comprende administrar a un mamífero una cantidad de una vacuna que comprende una combinación de proteínas variables de superficie de protozoos.

33. El método de acuerdo con la reivindicación 32, caracterizado porque se administra en la forma seleccionada el grupo consistente en oral, subcutánea, endovenosa e intramuscular.

34. El método de acuerdo con la reivindicación 32, caracterizado porque la combinación de proteínas variables de superficie se aíslan de un protozoo modificado que comprende silenciados a los genes seleccionados del grupo consistente en RdRP, Dicer y ambos.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 32, caracterizado porque comprende inmunizar un mamífero contra la infección de protozoarios, en donde dichos protozoarios tienen un mecanismo de variación antigénica.

36. El método de acuerdo con la reivindicación 32, caracterizado porque se administra al menos una dosis que comprende entre 50 y 500 µg de proteínas variables de superficie.

37. Una secuencia de nucleótidos caracterizada porque es una secuencia elegida entre las secuencias SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 112.

38. La secuencia de acuerdo con la reivindicación 37, caracterizada porque es una secuencia de ARNdc.

39. El uso de al menos una secuencia elegida entre las secuencias SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 112 para silenciar al gen RdRP.

40. El uso de al menos una secuencia elegida entre las secuencias SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 112 para silenciar al gen Dicer.

RESUMEN

Protozoos parásitos modificados que comprenden la expresión simultánea en su superficie de al menos dos proteínas variables de superficie (VSP). Los protozoos modificados pueden también expresar en forma simultánea el repertorio completo de proteínas variables 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. El protozoo puede ser cualquier protozoo que presente un mecanismo de variación antigénica.

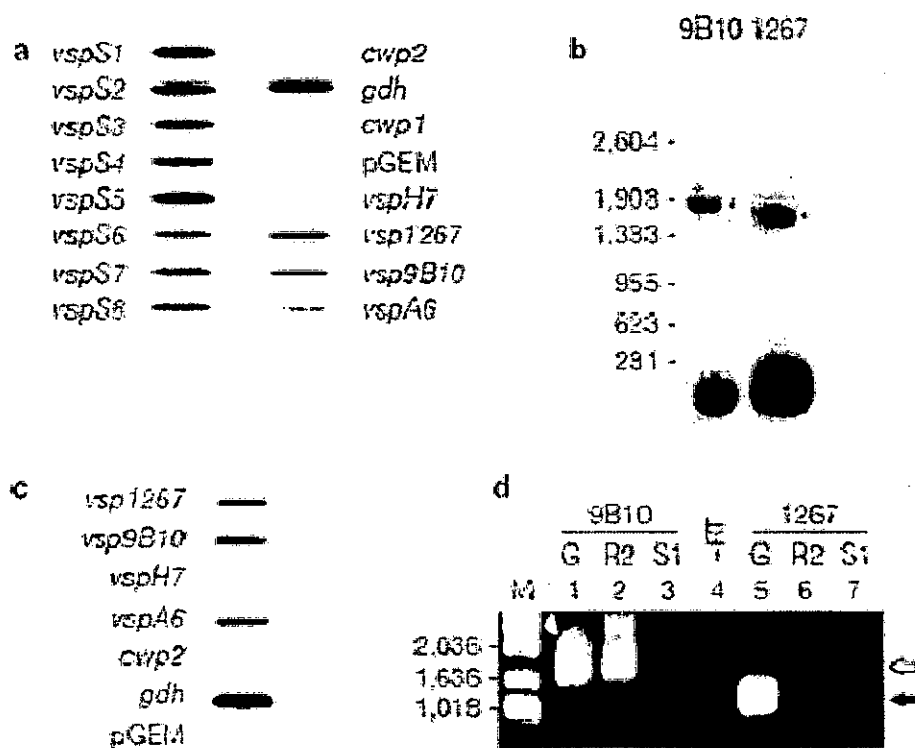
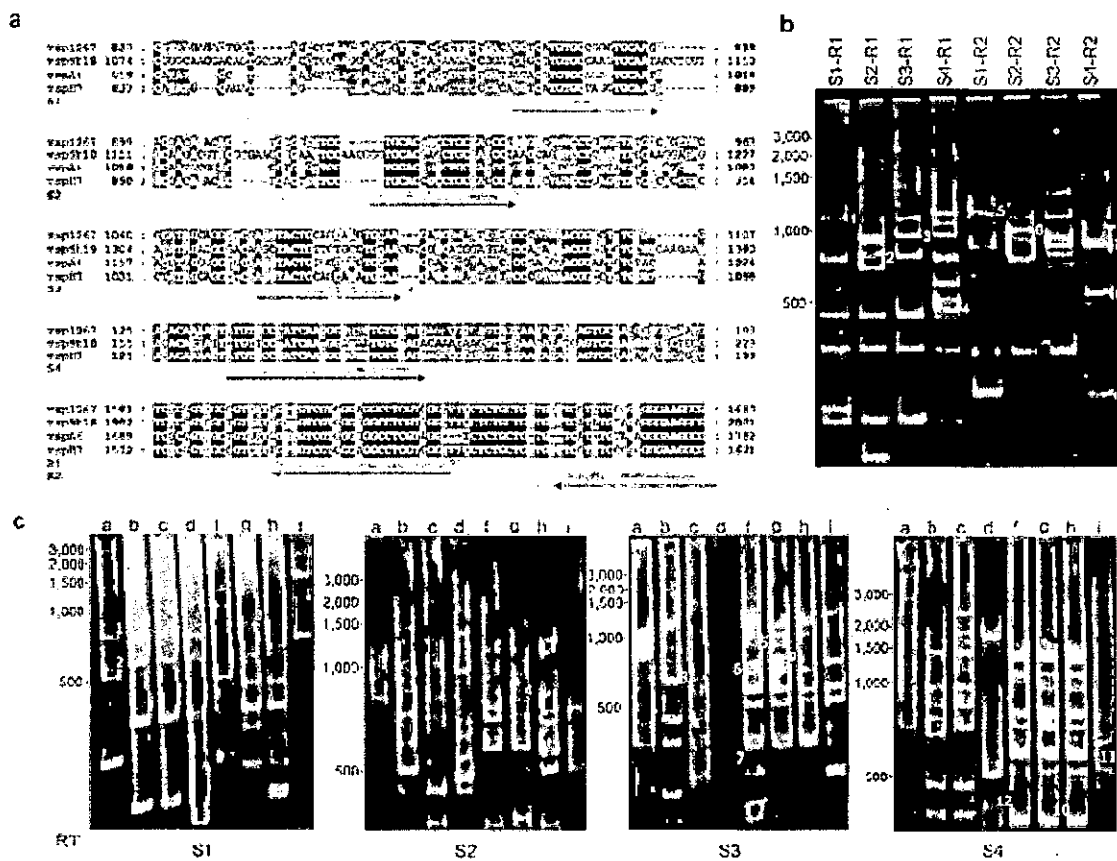


Fig. 1

115



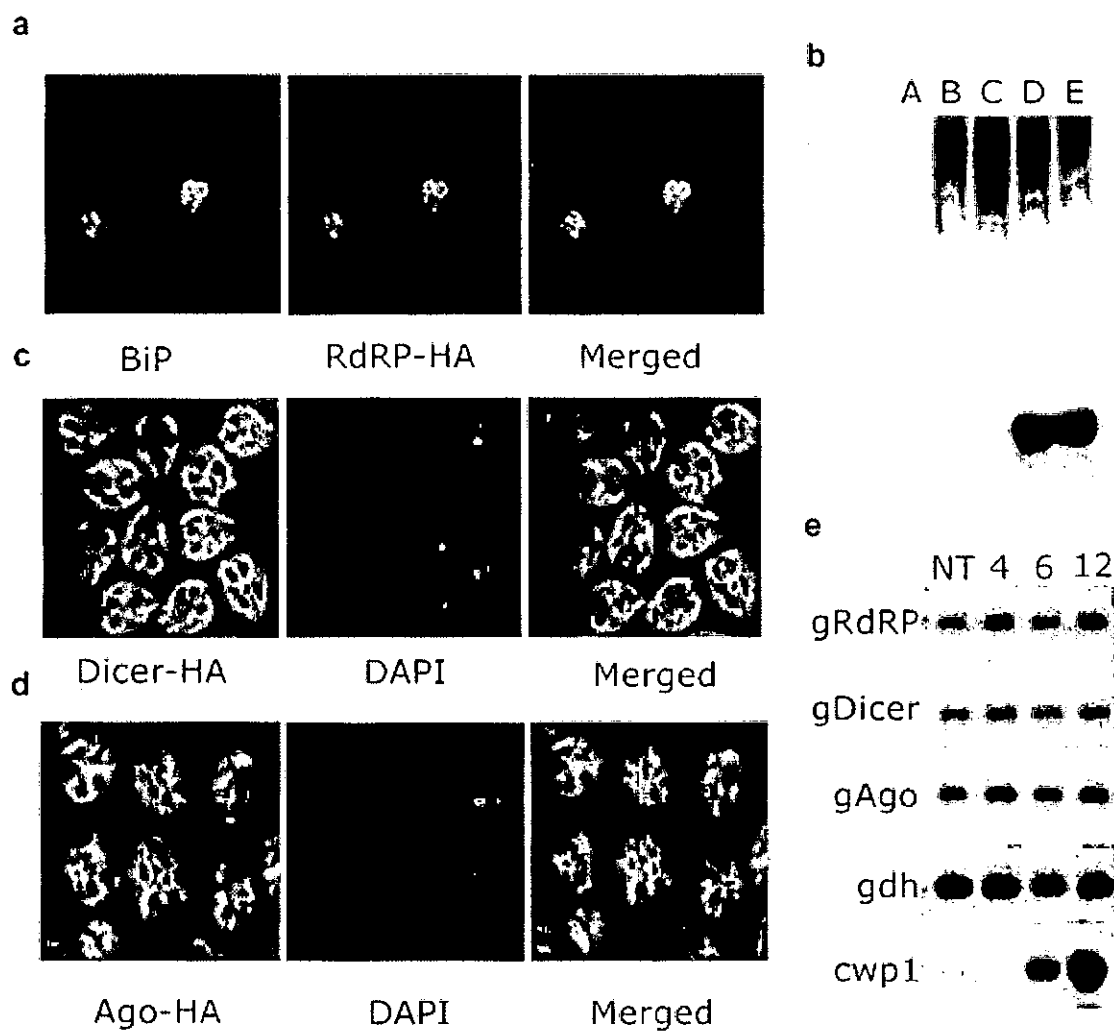


Fig. 3

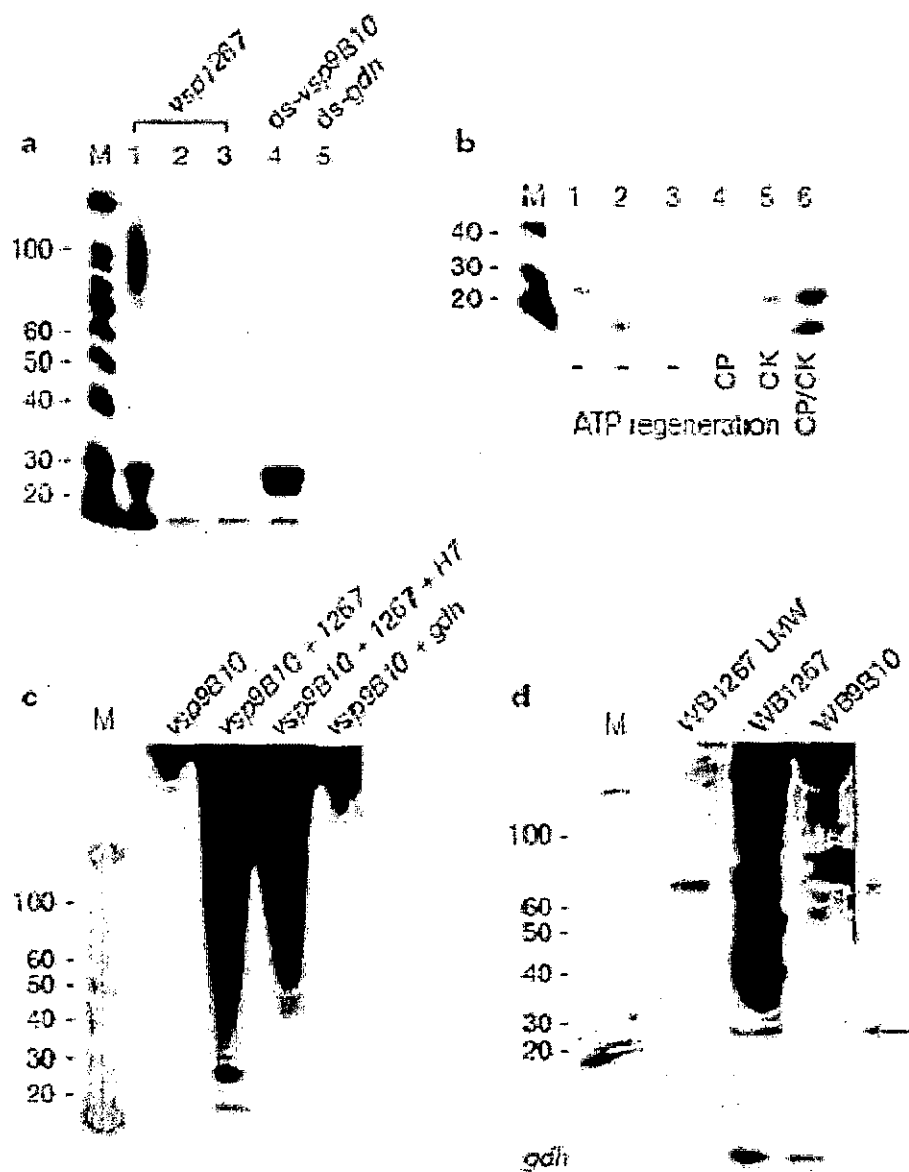


Fig. 4

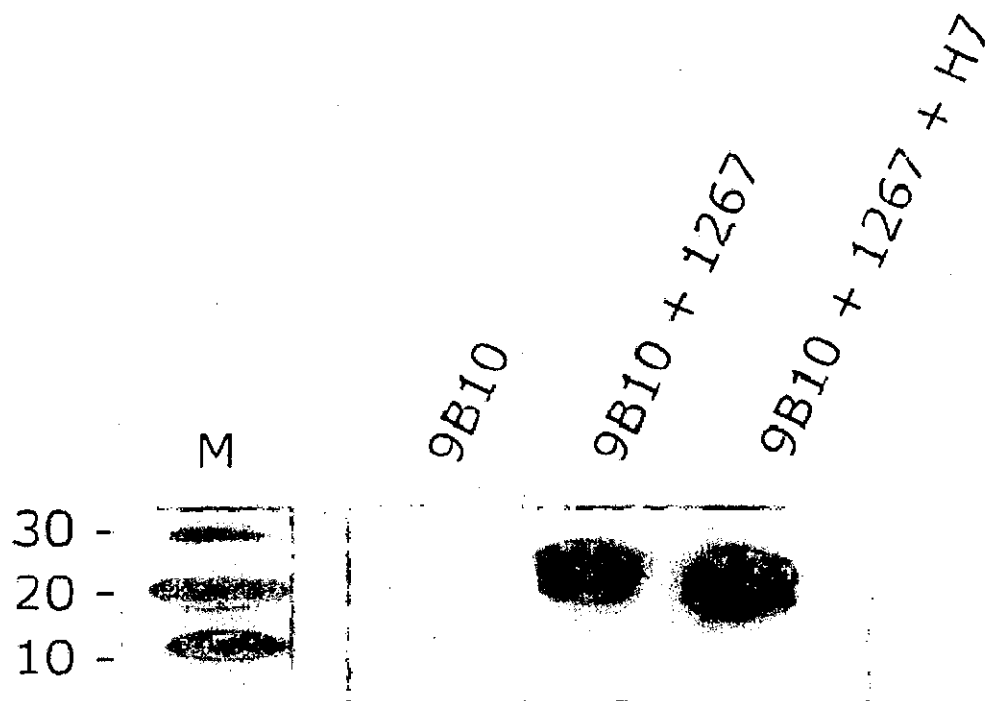


Fig. 5

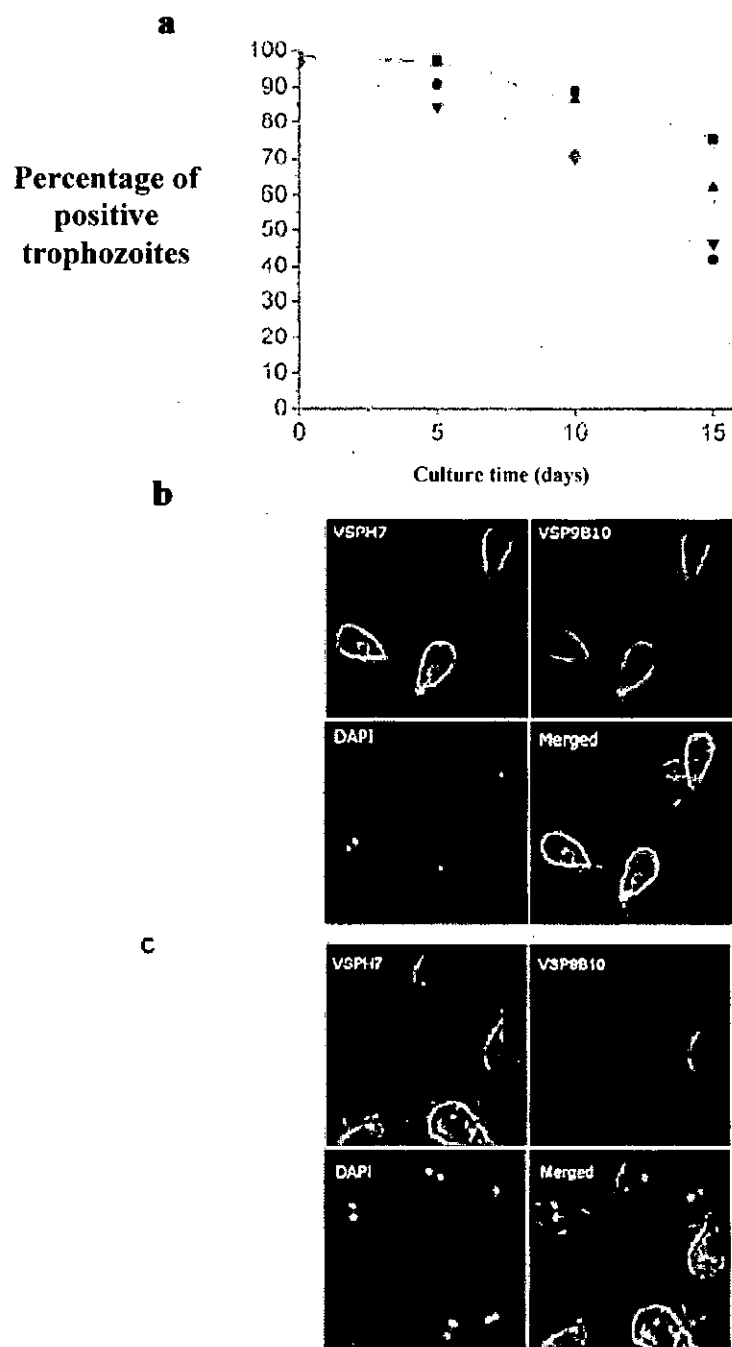


Fig. 6

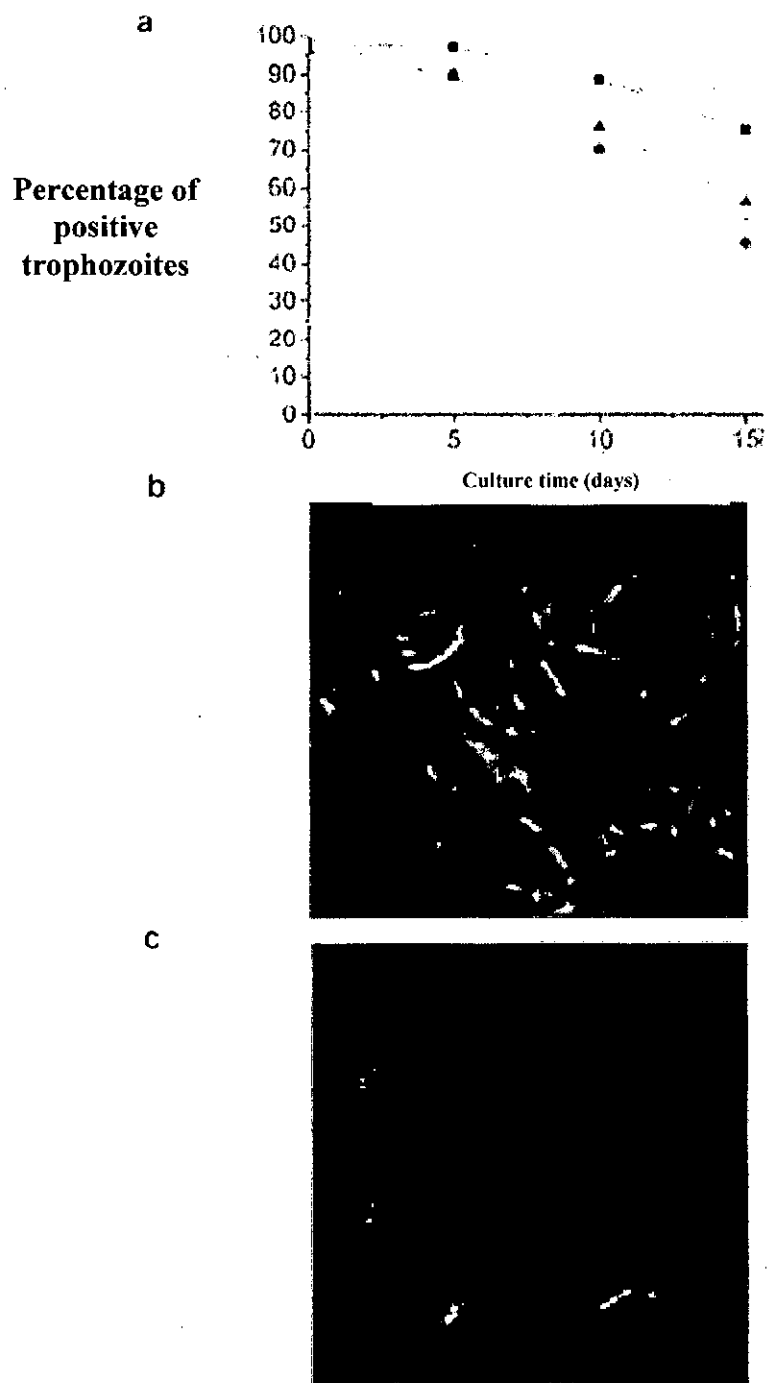


Fig. 7

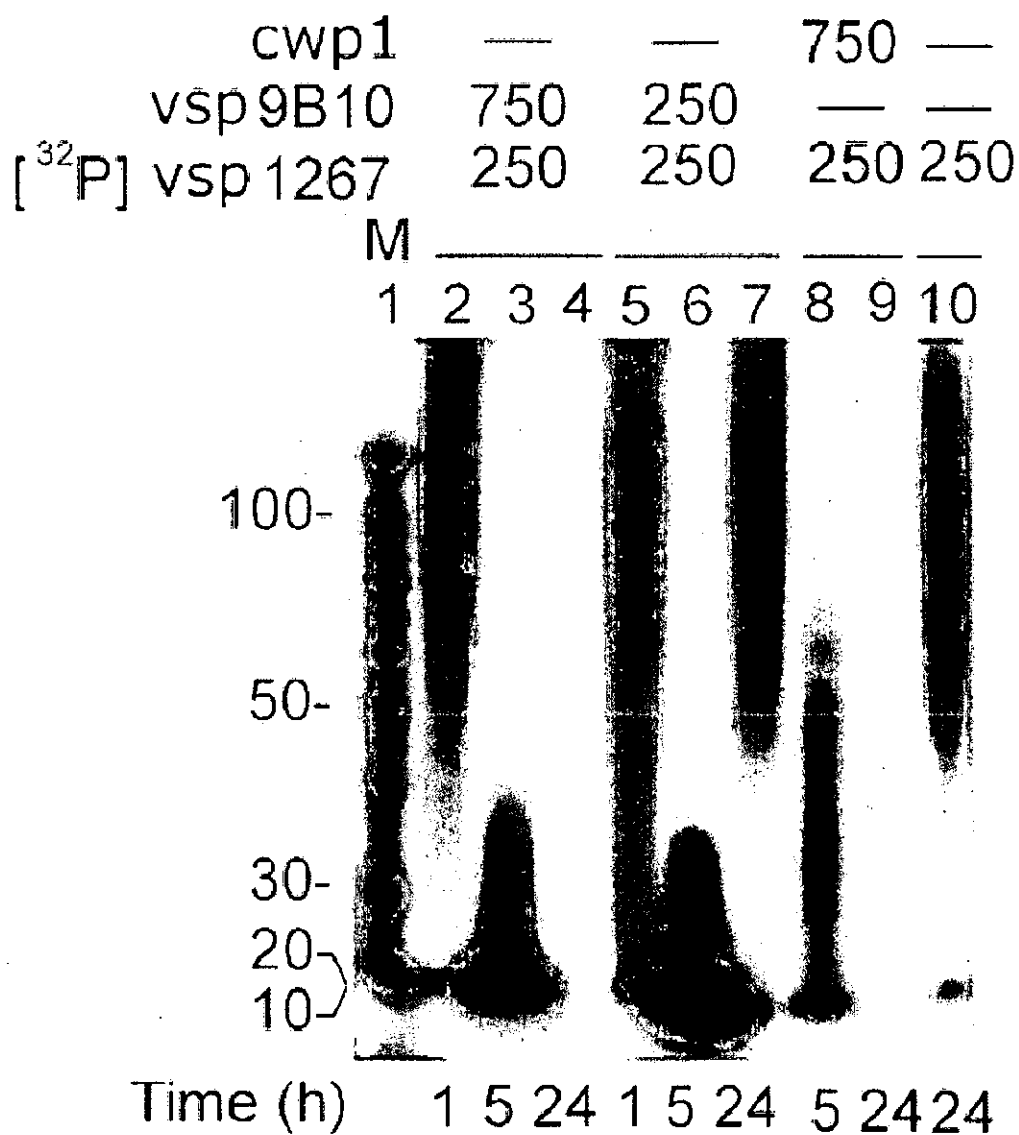
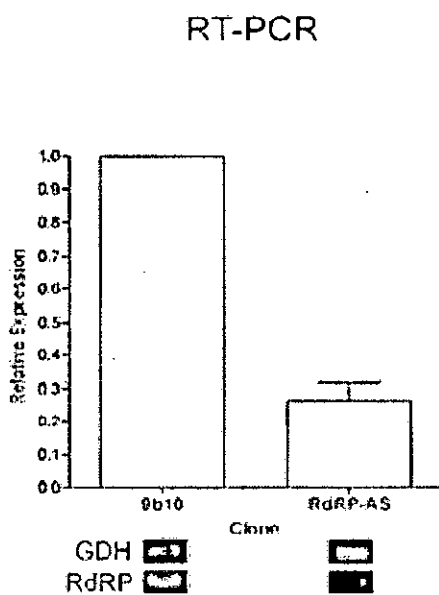
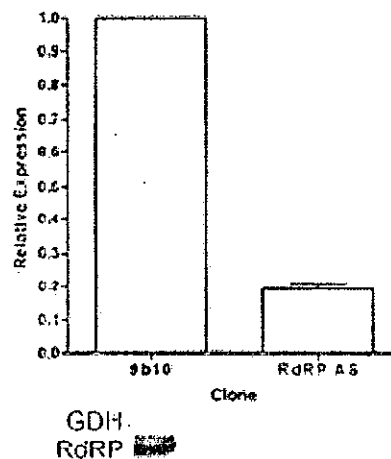


Fig. 8

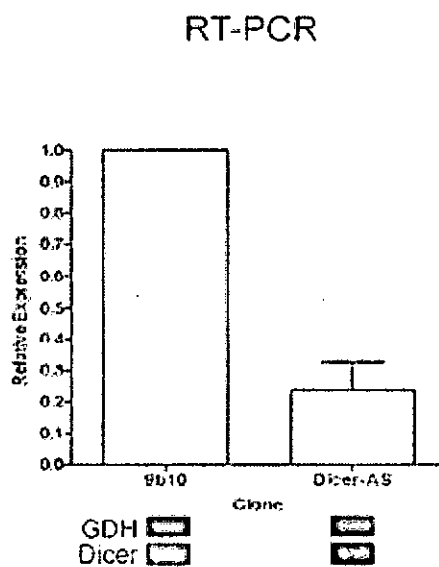
Relative
RdRP
Expression



Northern Blot



Relative Dicer
Expression



Northern Blot

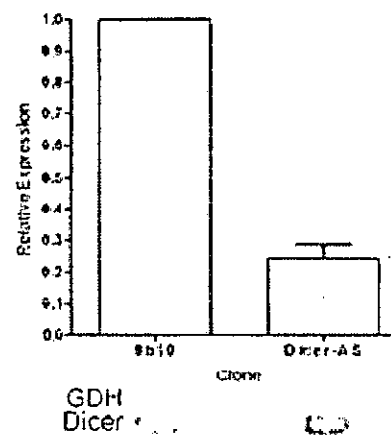


Fig. 9

123

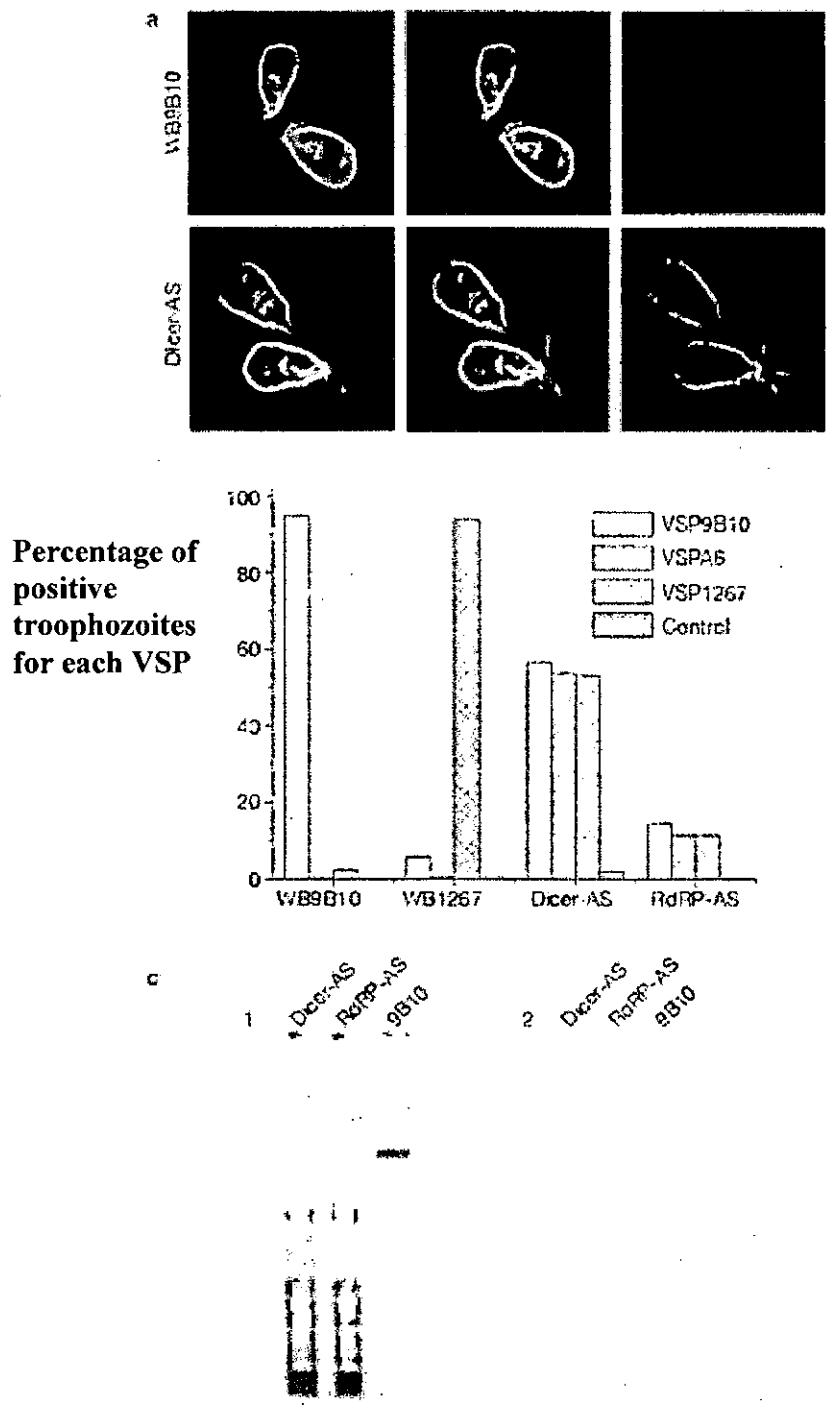


Fig. 10

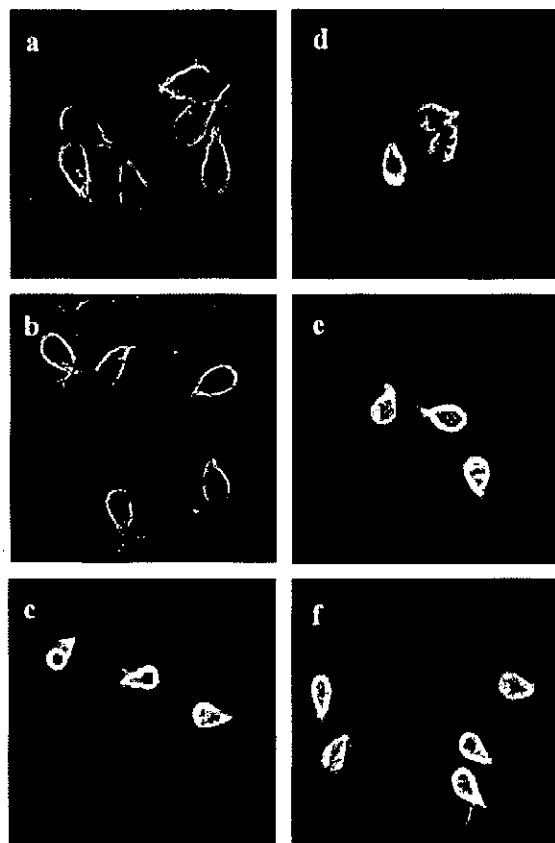


Fig. 11

	Primary infection	Reinfection with WB9B10	Reinfection with WB1267	Reinfection with cysts
9B10	a	e	i	m
1267	b	f	j	n
DAS	c	g	k	o
RAS	d	h	l	p

Fig. 13

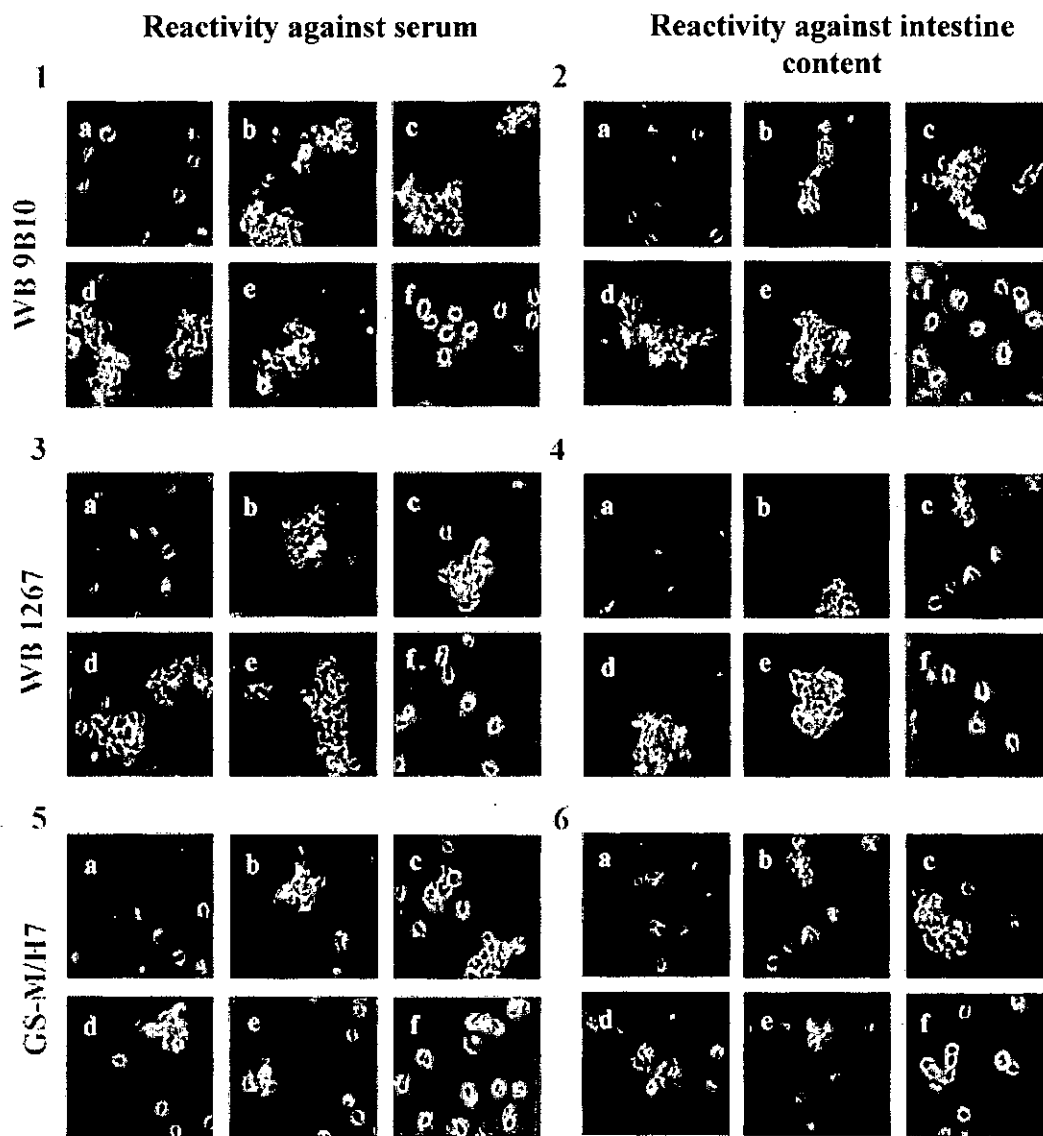


Fig. 14

120

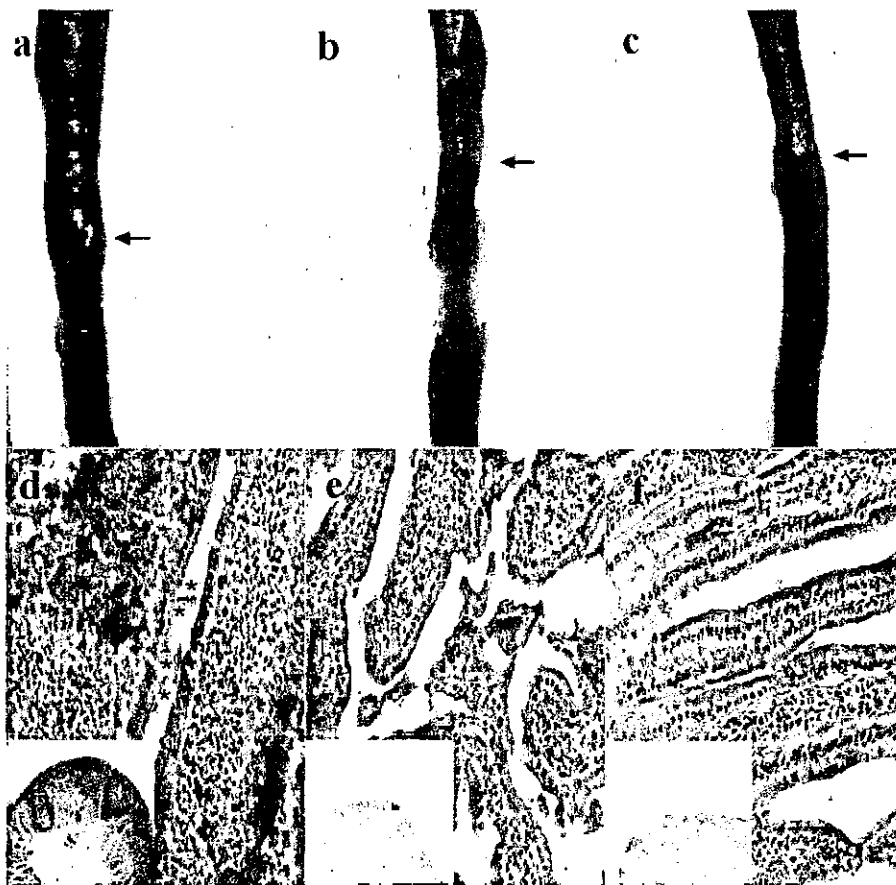


Fig. 16

hp LaserJet 4345mfp series



Informe llamadas fax

1

PWC
965208933
2011-May-31 11:12

Trab.	Fecha/Hora	Tipo	Identificación	Duración	Páginas	Resultado
530	2011-May-31 11:11	Enviar	0041223386270	0:42	1	Correcto



Landwell
PricewaterhouseCoopers
Tax & Legal Services

WORLD INTELLECTUAL
PROPERTY ORGANIZATION
INTERNATIONAL OFFICE
PCT
34, Chemin des Colombettes 1211 Geneve 20
Switzerland
Fax: (41-22) 3388270
Number of Pages: 1

Alicante, 31 May 2011

Ref.: PCT/IB 2009/055470 - Recording of Change of Applicants (O. Ref.: 7689)

Dear Sirs,

In relation to the abovementioned PCT application, we kindly ask you to proceed with the recording of the following changes regarding the applicants of the PCT application:

1. Applicants in all countries except for the United States of America

Please record Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) and Universidad Católica de Córdoba as the only applicants of the PCT application (for all countries except for the United States of America), according to the following details:

Name:	CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET)
Address:	Av. Rivadavia 1917, Buenos Aires, C1033AAJ (AR).
State of Nationality:	Argentina
State of Domicile:	Argentina
Name:	UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA
Address:	Obispo Trejo 323, Córdoba, X50001YG (AR).
State of Nationality:	Argentina
State of Domicile:	Argentina

2. Applicants only in the United States of America

No changes in relation to the applicants for the United States of America

Yours sincerely,

Eli Sells - PwC

Landwell - PricewaterhouseCoopers Tax & Legal Services, S.L., Morán, 25, Entlo., 03008 Alicante, España
T: +34 965 980 350 F: +34 965 208 933. www.pwc.com/es

(12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 07 December 2009 (07.12.2009)

Information valid as of: 21 June 2011 (21.06.2011)

Report generated on: 24 June 2011 (24.06.2011)

(10) Publication number:

WO2010/064204

(43) Publication date:

10 June 2010 (10.06.2010)

(26) Publication language:

English (EN)

(21) Application Number:

PCT/IB2009/055470

(22) Filing Date:

02 December 2009 (02.12.2009)

(25) Filing language:

English (EN)

(31) Priority number(s):

61/119,058 (US)

(31) Priority date(s):

02 December 2008 (02.12.2008)

(31) Priority status:

Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

(51) International Patent Classification:

A61K 35/68 (2006.01); A61K 39/002 (2006.01); C07K 14/44 (2006.01); C12N 15/113 (2010.01); C12N 1/20 (2006.01); C12R 1/90 (2006.01)

(71) Applicant(s):

CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET) [AR/AR]; Av. Rivadavia 1906 3 "F" Buenos Aires, C1033AAJ (AR) *(for all designated states except US)*

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA [AR/AR]; Obispo Trejo 323 Córdoba, X5000IYG (AR) *(for all designated states except US)*

INIS BIOTECH LLC [US/US]; 203 NE Front Street, Suite 101 Milford, Kent County, Delaware Milford, Delaware 19963 (US) *(for all designated states except US)*

LUJAN, Hugo Daniel [AR/AR]; Jacinto Rios 571 Córdoba, X5004ASK (AR) *(for US only)*

(72) Inventor(s):

LUJAN, Hugo Daniel; Jacinto Rios 571 Córdoba, X5004ASK (AR)

(54) Title (EN): MODIFIED PROTOZOAN EXPRESSING AT LEAST TWO VARIABLE SURFACE PROTEINS (VSP), A VACCINE COMPRISING IT AND PROCEDURES, USES, AND METHODS THEREOF

(54) Title (FR): PROTOZOAIRE MODIFIÉ EXPRIMANT AU MOINS DEUX PROTÉINES DE SURFACE VARIABLES (VSP), VACCIN LE COMPRENANT ET PROTOCOLES, UTILISATIONS ET PROCÉDÉS ASSOCIÉS

(57) Abstract:

(EN): Modified protozoa parasites comprising simultaneous expression on its surface of at least two variable surface proteins (VSP). The modified protozoa may also simultaneously express the complete repertoire of variable surface proteins. Protozoa show reduced expression of Dicer, RNA-dependant RNA-polymerase (RdRP) enzymes or both, wherein the RdRP gene and/or the Dicer gene has been silenced. The protozoan may be any protozoan showing an antigenic variation mechanism.

(FR): L'invention concerne des protozoaires parasites modifiés capables d'expression simultanée sur leur surface d'au moins deux protéines de surface variables (VSP). Les protozoaires peuvent également simultanément exprimer le répertoire complet des protéines de surface variables. Les protozoaires présentent une expression réduite d'enzymes Dicer, ARN-polymérase dépendante de l'ARN (RdRP) ou des deux, le gène de RdRP et/ou le gène de Dicer ayant été rendus silencieux. Les protozoaires peuvent être des protozoaires quelconques présentant un mécanisme de variation antigénique.

International search report:

Received at International Bureau: 16 September 2010 (16.09.2010) [EP]

International preliminary examination report:

Not available

(81) Designated States:

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH; CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW
European Patent Office (EPO) : AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR
African Intellectual Property Organization (OAPI) : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) : BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
Eurasian Patent Organization (EAPO) : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 June 2010 (10.06.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/064204 A2

- (51) International Patent Classification:
C12N 1/11 (2006.01) A61K 39/002 (2006.01)
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): LUJAN, Hugo Daniel [AR/AR]; Jacinto Ríos 571, Córdoba, X5004ASK (AR).
- (21) International Application Number: PCT/IB2009/055470
- (22) International Filing Date: 2 December 2009 (02.12.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 61/119,058 2 December 2008 (02.12.2008) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET) [AR/AR]; Av. Rivadavia 1906 3 "F", Buenos Aires, C1033AAJ (AR). UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA [AR/AR]; Obispo Trejo 323, Córdoba, X5000IYG (AR). INIS BIOTECH LLC [US/US]; 203 NE Front Street, Suite 101, Milford, Kent County, Delaware, Milford, Delaware 19963 (US).
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: MODIFIED PROTOZOAN EXPRESSING AT LEAST TWO VARIABLE SURFACE PROTEINS (VSP), A VACCINE COMPRISING IT AND PROCEDURES, USES, AND METHODS THEREOF

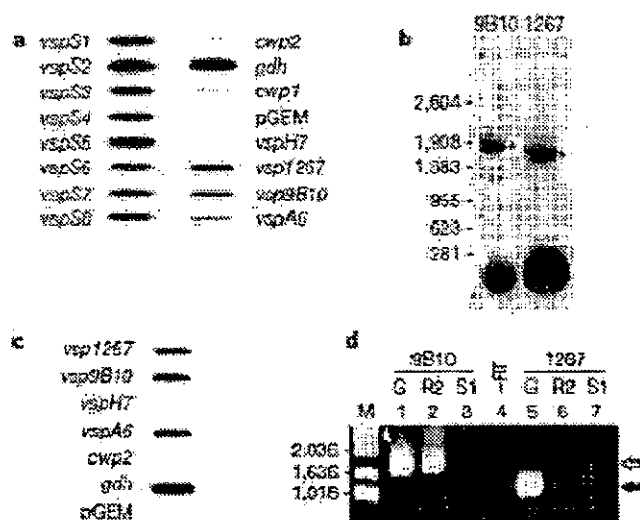


Figure 1

(57) Abstract: Modified protozoa parasites comprising simultaneous expression on its surface of at least two variable surface proteins (VSP). The modified protozoa may also simultaneously express the complete repertoire of variable surface proteins. Protozoa show reduced expression of Dicer, RNA-dependant RNA-polymerase (RdRP) enzymes or both, wherein the RdRP gene and/or the Dicer gene has been silenced. The protozoan may be any protozoan showing an antigenic variation mechanism.

**MODIFIED PROTOZOAN EXPRESSING AT LEAST TWO VARIABLE SURFACE
PROTEINS (VSP), A VACCINE COMPRISING IT AND PROCEDURES,
USES, AND METHODS THEREOF**

The present invention refers to modified protozoa expressing more than one variable surface protein (VSP), a vaccine comprising it, a hybridoma line, a protein-recognizing monoclonal antibody, procedures, uses, and methods thereof. More specifically, it refers to modified parasite protozoa comprising simultaneous surface expression of more than one variable surface protein (VSP). Modified protozoa may also simultaneously express the complete repertoire of variable surface proteins. Protozoa show reduced expression of Dicer, RNA-dependant RNA-polymerase (RdRP) enzymes or both, where the RdRP gene and/or the Dicer gene have been silenced. The protozoan may be any protozoan having an antigenic variation mechanism and the expression may be silenced by molecules regulating this mechanism.

BACKGROUND

The antigenic variation is a clone phenotypical change developed by pathogenic microorganisms involving surface exposed antigenic determinants. These organisms use different mechanisms to change their surface antigen expression, thus being able to maintain a chronic infection under the continuous immune pressure generated by the host (Deitsch, K. W., Moxon, E. R. & Wellems, T. E. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 281-293 (1997)). *Giardia lamblia* (also runwayd *Giardia intestinalis* or *Giardia duodenalis*) is one

of the most common human intestinal parasites. Protozoan *G. lamblia* also shows antigenic variation (Adam, R. D. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447-475 (2001) and Nash, T. E. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 352, 1369-1375 (1997)), in a process that allows the parasite to develop chronic and/or recurrent infections. From a repertoire of about 190 genes codifying variable surface proteins (VSPs), *Giardia* only expresses one VSP on the surface of each parasite at a particular time, but spontaneously switches to a different VSP by an unknown mechanism. In *Giardia*, antigenic variation is responsible for the variable and/or persistent course of some infections, as well as the tendency to multiple infections, and involves a protein family known as VSPs (Adam, R. D. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447-475 (2001) and Nash, T. E. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 352, 1369-1375 (1997)).

VSPs line the complete trophozoite surface and are the main antigens recognized by the host immune response. VSPs range in size between 30 kDa and 200 kDa; they possess a variable cysteine-rich amino-terminal region and a conserved carboxy-terminal region that includes a hydrophobic transmembrane domain and a short cytosolic tail comprising only 5 amino acids (CRGKA). The parasite genome encodes a repertoire of ~190 genes codifying VSPs (Morrison, H. G. et al. Science 317, 1921-1926 (2007)), but only one VSP is expressed at any given time on the surface of each trophozoites. Switching to the expression of another VSP occurs once every 6-13 generations, even in the absence of any immunological pressure (Nash, T. E., Alling, D. W., Merritt, J. W. Jr & Conrad, J. T. Exp. Parasitol. 71, 415-421 (1990)). Similarly to the rest of *G. lamblia*

genes, the VSPs codifying genes have no introns and their upstream regions are relatively short and have been found to have limited or no sequence conservation. Moreover, there are no typical eukaryotic promoters present in these regions. The non-translated 3' regions of messenger RNA including *Giardia* VSPs genes also tend to be short, typically 0-30 nucleotides long. So far, neither gene-rearrangement processes nor promoter-dependent switch-on/switch-off mechanisms have been demonstrated to be involved in *Giardia*'s antigenic switching (Adam, R. D. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447-475 (2001); Nash, T. E. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 352, 1369-1375 (1997) and Nash, T. E., Alling, D. W., Merritt, J. W. Jr & Conrad, J. T. Exp. Parasitol. 71, 415-421 (1990).

BRIEF DESCRIPCION OF THE INVENTION

Modified parasite protozoa comprising simultaneous surface expression of more than one variable surface protein (VSP) are provided. In a preferred embodiment the protozoa comprise the simultaneous surface expression of the complete repertoire of variable surface proteins. Protozoa show a reduced expression of the Dicer, RNA-dependant RNA-polymerase (RdRP) or both, where the RdRP gene or the Dicer gene has been silenced, or a mixture thereof. The protozoan may be any protozoa showing an antigenic variation mechanism, where its antigenic variation mechanism may be unregulated by silencing any of its components.

A vaccine against infections produced by protozoa comprising at least a modified protozoan expressing on its

130

surface at least two variable surface proteins (VSP) is provided. In a preferred embodiment the protozoa comprise simultaneous expression of the complete repertoire of variable surface proteins on its surface. Protozoa show reduced expression of the Dicer, RNA-dependant RNA-polymerase (RdRP) enzymes or both, where the RdRP gene or the Dicer gene has been silenced, or a mixture thereof. The protozoan may be any protozoan showing an antigenic variation mechanism. The vaccine may also comprise excipients and/or adjuvants.

A procedure to purify the complete repertoire of protozoan variable surface proteins (VSP) is provided, comprising:

- a) linking an antibody recognizing the VSP CRKGA amino acid sequence of to a solid support;
- b) contacting the solid support to protozoa; and
- c) separating the complete repertoire of variable surface proteins (VSP). The protozoa may be a mixture of wild protozoa clones, where each clone expresses a different variable surface protein or may be a clone expressing the complete VSPs repertoire

A vaccine comprising more than one protozoan variable surface protein is provided, where each of said proteins is different; and excipients and/or adjuvants. In a preferred embodiment the vaccine comprises the complete repertoire of protozoan variable surface proteins, where each of said proteins is different.

An immunization method comprising administering to a mammal an amount of a vaccine comprising modified protozoan expressing at least two variable surface proteins (VSP) or expressing simultaneously the complete repertoire of

protozoan VSPs is provided. The method is applied in order to immunize a mammal against infections produced by protozoa, where said protozoa have an antigenic variation mechanism.

In addition, an immunization method comprising administering to a mammal an amount of a vaccine comprising a combination of protozoan variable surface proteins is provided, where the combination of variable surface proteins is isolated from a modified protozoan comprising silenced RdRP genes, Dicer genes or both. The method is applied to immunize a mammal against infections produced by protozoa, where said protozoa have an antigenic variation mechanism. In an embodiment, the administered vaccine dose comprises between 50 and 500 µg of protozoan variable surface proteins.

A nucleotide sequence is provided, wherein said sequence may be chosen between anyone of sequences SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 112, wherein said sequences are ARNdc.

The use of at least a sequence chosen between anyone of sequences SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 112 is provided to silence the RdRP gene or to silence the Dicer gene.

DESCRIPTION OF FIGURES

Figure 1 shows that several VSP genes in *Giardia* are simultaneously transcribed; a: nuclear run-on assay using recently isolated *Giardia* nuclei induced to transcribe *in vitro* in the presence of [32P] UTP; b: Northern blot test of total RNA extracted from clones WB9B10 and WB1267 using a probe comprising the preserved region present in all VSPs; c: sense and antisense transcripts (vsp9B10, vsp1267,

140

vspA6, vspH7, cwp2 and GDH) generated *in vitro*, were blotted and hybridized with the assay products of nuclear run on in the same conditions as figure 1a; d: Comparison between PCR products generated from clone WB9B10 trophozoites with specific primers (9B10F/9B10R and 1267F/1267R) on the genomic DNA (runways 1 and 5), or cDNA generated either with reverse probe R2 (runways 2 and 6) or sense probe S1 (runways 3 and 7), runway 4 is a reaction control without RT, the white arrow indicates the vsp9B10 fragment, which is present in a genomic DNA and in sense cDNA but not in antisense cDNA, the black arrow indicates the vsp1267 fragment present in genomic DNA, in sense cDNA and in antisense cDNA. M means molecular marker.

Figure 2 shows the new tools to study antigenic variation in *G. lamblia*. a: Suitable oligonucleotides to be amplified by PCR to a great amount of VSP codifying genes were generated; sequences of four *G. lamblia* VSPs isolated from (VSP1267, VSP9B10, and VSPA6) and GS (VSPH7) were selected, these four VSP sequences were aligned and the four preserved regions were used to design primers; the arrows below oligonucleotide sequences denote sequences were generic VSP primers (S1-S4 and R1-R2) were designed; b: combination of four sense primers (S1-S4) and dos reverse primers (R1, R2) was used in PCR test of genomic DNA from *Giardia* WB9B10 clone, which only expresses VSP9B10 on its surface, several DNA fragments were amplified independently of the primer combinations used and fifty-nine main products of these reactions were isolated, cloned and sequenced, revealing that they all codified VSP fragments, several of these products (labeled 1 to 8 in

white) were subsequently used as probes for the scrutiny of a genomic DNA library, which allowed to identify ORFs (open reading frameworks) codifying new proteins with *Giardia* VSP typical features (VSPS1-S8, GenBank access numbers: AY142122 to AY142129), size markers in nt (nucleotides) are shown at the left-hand side. c: to verify if *Giardia* VSP transcript silencing implied VSP antisense ARN, these molecules were searched for in ARN preparations isolated from trophozoites expressing a unique VSP, RT-PCR were carried out with the same VSP primer combinations previously used in the genomic DNA but using sense primers during the reverse transcription reaction (RT), sense primers (S1 to S4) are shown on top, runways (a) to (h) indicate primer combinations used in each PCR reaction: (a) S1-R1, (b) S2-R1, (c) S3-R1, (d) S4-R1, (e) S1-R2, (f) S2-R2, (g) S3-R2, and (h) S4-R2; in addition, negative controls without reverse transcriptase (RT-) are shown. In these conditions thirty eight amplified products were isolated, cloned and sequenced, demonstrating antisense codifying VSPs, twelve of these products (marked 1 to 12 in target) were also used as probes in a genome library, which allowed to obtain the complete sequence of new VSP genes (VSPAS1-VSPAS12, GenBank access numbers AY143130 - AY142141), indicating functional targets of VSP genes antisense transcripts.

Figure 3 shows a: immunolocation of the gRdRP version labeled with a HA epitope expressed in WB9B10 clone trophozoites, the Ia enzyme (in red) is localized in a region surrounding both parasite nuclei; this region mainly refers to rough endoplasmic reticulum (yellow) as seen by

142

co-immunolocalization with chaperone ER-BiP (Mab 9C9, in green); b: RdRP activity, wherein different RNA substrate combinations were used (A, B, and D; vsp9B10 and vsp1267; C and E; vsp9B10, vsp1267, and vspH7), in absence (A-C) or in presence of primer R1 (D) or R2 (E), A is a control without purified RdRP. c: immunolocalization of a gDicer version labeled with a HA epitope expressed in WB9B10 clone trophozoites, the enzyme (in green) localizes in the cell cytoplasm, nuclei are stained with DAPI (blue); d: immunolocalization of a gAgo version signaled with a HA epitope, which is expressed in WB9B10 clone trophozoites, the enzyme (in green) is localized in the cell cytoplasm, nuclei are stained with DAPI (blue); e: Northern blot with probes for gRdRP, gAgo, gDicer, GDH and CWP1 on total RNA extracted from WB9B10 clone trophozoites induced to cyst formation during 4, 6, or 12 h, and trophozoites maintained in a normal growth medium (NT) for 12 h., results show the constitutive expression of these PTGS components (post transcriptional gene silencing).

Figure 4 shows Dicer activity and detection of small VSP RNA in *Giardia*. a: generation of small RNAs from dsRNA by *Giardia* extract demonstrating a Dicer-type activity. For vsp1267dsRNA, both strands (runway 1), sense RNA strand only (runway 2) or antisense only (runway 3) were radioactively labeled. For vsp9B10 and gdh, both strands were labeled. Double-strand RNAs were incubated with a *Giardia* extract from WB9B10 clone at 37°C for 1 h; then, total RNA was isolated and used for electrophoresis. In all cases, small RNA were obtained; b: effect of the presence of ATP in dsRNA processing by *Giardia*, runways 1

and 2 show non-treated controls: incubation of vsp1267 dsRNA with *Giardia* cytoplasmic lysates without wasting ATP (1h and 3h incubation, respectively), ATP reduction by addition of 2 mM glucose and $0.1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ of hexo-kinase (runway 3). ATP regeneration using phosphocreatine (CP, runway 4), creatine kinase (CK, runway 5), or both (runway 6); c: generation of small RNAs by incubation of VSP riboprobes with extracts from *Giardia* WB9B10 clone. One, two or three different VSP RNAm (vsp9B10, vsp1267, vspH7) were blended with the *Giardia* extracts. Formation of small RNAs occurred in the presence of more than one transcript. *gdh* was used as non-related gene control. RNA size markers in nucleotides are on the left-hand side; d: total WB9B10 clone RNA and of WB1267 clone trophozoites, as well as low molecular weight WB1267 clone RNA (LMW-low molecular weight) were subjected to electrophoresis, blotted and hybridized using partially digested vsp9B10 RNA probes transcribed in-vitro. No small RNA was found in the WB9B10 clone; in contrast, small vsp9B10 RNAs were present in the WB1267 clone (arrow), which does not express VSP9B0. Curiously, 70-nucleotides long RNAs (asterisk) were found which could represent partially digested RNAm.

Figure 5 shows generation of small RNAs by incubation of VSP riboprobes with *Giardia* WB1267 clone extracts; one, two, or three RNAm of different VSP (vsp9B10, vsp1267, vspH7) were blended and confronted to the *Giardia* trophozoite extracts, small [32P] marked RNA were generated when more than one transcript was present, RNA size markers in nucleotides are on the left-hand side.

Figure 6 shows an antigenic commutation in WB9B10 trophozoites overexpressing VSPH7. a: WB9B10 clone trophozoites were transfected with pTubCWP1.Pac vector or with pTubH7.Pac vector, directing CWP1 or VSPH7 expression under control of the α -tubulin promotor, with controls from trophozoites from the GS strain expressing VSP H7 transfected with control vector (pTubCWP1.Pac) indicated by inverted triangles, squares showing WB9B10 trophozoites transfected with control vector, VSP 9B10 expression diminishes with time due to spontaneous exchange of the surface proteins, with WB9B10 trophozoites constitutively expressing vspH7 showing that the VSP9B10 (circles) or VSPH7 (triangles) expression diminished faster than the respective control. Results represent average percentage of three independent experiments $\pm$ SD. b: Representative image of WB9B10 trophozoites expressing VSPH7 on time 0, all cells simultaneously expressing VSP9B10 and VSPH7 on its surface; c: representative image of WB9B10 trophozoites expressing VSPH7 after 15 days culture, some cells express VSP9B10 and VSPH7 on its surface, others VSP9B10 or VSPH7 only and other neither one; nuclei were marked with DAPI in blue;

Figure 7 shows antigenic commutation in WB9B10 trophozoites expressing vsp9B10 antisense fragments. a: WB9B10 clone trophozoites were transfected with vector pTubCWP1.Pac vector (squares) or pTubPac vector including antisense sequences of the mean portion media of vsp9B10 gene 5' (circle) or 3' (triangle); results represent average value of three independent experiments $\pm$ SD and indicate that the amount of VSP 9B10 positive trophozoites diminish

145

faster than control; b: representative image of WB9B10 trophozoites transfected with a different VSP gene, with all cells expressing VSP9B10 on its surface; c: representative image of WB9B10 trophozoites expressing the antisense fragment 3' of vsp9B10 after 15 days culture, VSP9B10 is present in about 50% of population; nuclei were marked with DAPI in blue.

Figure 8 shows that variations in concentration of different transcripts may determine which one evades the silencing system. VSP codifying 1267, vsp9B10, and cwpl genes were cloned in pGEM-T-easy vector and transcribed in vitro in the presence or absence of 32P-UTP, different concentrations of non-marked vsp9B10 and CWP1 transcripts were generated during different periods of time with WB1267 cytoplasmic extracts containing a fixed concentration of vsp1267 radioactively marked RNA, runway 1: marker of dozens of nucleotides (Decade-Ambion), runways 2, 3 and 4: incubation of 750 ng vsp9B10 and 250 ng vsp1267 (ratio 3:1), 1, 5 and 24 h, respectively, runways 5, 6 and 7: incubation equal amounts of vsp9B10 and vsp1267 (250 ng each; ratio 1:1), 1, 5 and 24 h, respectively, runways 8 and 9: incubation of 750 ng CWP1 and 250 ng vsp1267, 5 and 24 h, respectively, runway 10: incubation of 250 ng vsp1267 transcript, in short incubation periods (1 h) there is little vsp1267 degradation in WB1267 clone, independently of the amount of vsp9B10 added to the mixture (runways 2 and 5). In contrast, after longer incubations (5 hs) the appearance of small radiolabeled vsp1267 RNAs increases by the presence of vsp9B10 (compare runway 10 with runways 3, 6 and 8), the presence of CWP1 transcripts (not related)

has no effect, including at high concentration (runway 8). At 24 hs incubation, most radiolabeled transcripts are totally broken down;

Figure 9 shows the results of silencing the Dicer and RdRP gene in *Giardia* trophozoites, wherein *Giardia* Dicer-AS and RdRP-AS clones present a reduction of RNA messenger levels of between 65% and 75% in comparison with non-transfected WB9B10 trophozoites measured by densitometry assays of bands obtained by RT-PCR and Northern blot performed five times, where results represent average value $\pm$ s.d.

Figure 10 shows the expression of different VSPs in transgenic *Giardia* trophozoites with silenced RdRP and Dicer enzymes, a: direct of immunofluorescence assays in Dicer-AS transfected trophozoites (lower panel) or empty vector (top panel) using TRITC conjugated to 5C1 monoclonal antibody (VSP1267; right panel) and FITC conjugated to 9B10 monoclonal antibody (VSP9B10; left panel), when Dicer expression in *Giardia* was silenced, trophozoites expressing surface VSP9B10 also expressed VSP1267 (fused image; central panel); b: percentage of *Giardia* trophozoites expressing a particular VSP, as determined by flow cytometry assays using specific monoclonal antibodies (VSP9B10, 9B10 monoclonal antibody; VSP1267, 5C1 monoclonal antibody; VSPA6, 6E7 monoclonal antibody) in 9B10, 1267, clones and with transfected cells with antisense constructions for *Giardia* RdRP (RdRP-AS) or Dicer (Dicer-AS), as negative control were used anti-rat goat immunoglobulins; c: Western blot test of protein extracts

of wild type WB9B10 and trophozoites WB9B10 wherein Dicer gene has been knocked out, after electrophoresis and transference to nitrocellulose, filters were hybridized with: (1) 12F1 monoclonal antibody G3 clone of the invention (generated against the CRGKA preserved domain in all VSPs) or (2) 9B10 monoclonal antibodies (specific for VSP9B10).

Figure 11 shows the expression of VSPs in wild type *Giardia* clones and in *Giardia* modified with deregulation of antigenic variation; confocal immunofluorescence images of trophozoites are shown, where Dicer (a) or RdRP (b) have been silenced and representative images of indirect immunofluorescence assays using anti-VSP monoclonal antibodies (green) un contrast with DAPI (blue), WB9B10 (d), WB1267 (e), and GS/M-H7 (f), and (c) immunofluorescence image of an isolated non-cloned WB population stained with anti-CRGKA 12F1 monoclonal antibody of the invention (green) and counterstained with DAPI (blue).

Figure 12 shows detection and quantification of *Giardia* cysts in deposition samples from gerbils infected with different populations of wild type and transgenic trofozitos, and challenged with WB9B10 and WB1267. (a) Gerbils initially infected with clone populations of WB9B10, WB1267, or transgenic trophozoites silenced for the expression of Dicer (DAS) or RdRP (RAS) and mixtures 1:1 of both. (b-e) Gerbils previously infected with *Giardia* WB9B10 (b), WB1267 (c), DAS (d) and RAS (e) were challenged two months after primary infection with clone populations of

149

WB9B10 and WB1267; the amount of cyst released by the animals were counted. Figures represent the mean value of five different experiments;

Figure 13 shows the results of the challenge of gerbils with trophozoites expressing a particular VSP continuing the primary infection with *Giardia* trophozoites expressing complete repertoire of VSPs. Gerbils previously infected with WB9B10, WB1267, DAS, or RAS clones (a-d) were challenged with populations of WB9B10 (e-h), WB1267 clones (i-l), or purified cysts (m-p). The figure shows representative images of immunofluorescence assays in gerbil feces using monoclonal antibodies conjugated with anti-CWP2 FITC (green).

Figure 14 shows that serum and intestine content of gerbils infected with transgenic trophozoites expressing the complete repertoire of VSPs are capable of agglutinating different *Giardia* clones in vitro. Representative images are shown of phase contrast microscopy of WB9B10 (1-2), WB1267 (3-4), and GS/M H7 clones (5-6) challenged with serum (1b, 3f, and 5f) or intestinal content (2b, 4f, and 6f) of animals infected with WB9B10 clones; serum (2b and 1f), or intestinal content (3b and 2f) of animals infected with WB1267 clones; serum or intestinal content of animals infected with GS/M-H7 clones (5b and 6b); Mab specific for VSP9B10 (1c and 2c), Mab for VSP1267 (3c and 4c), Mab for VSPH7 (5c and 6c), serum of non-infected animals (1a, 2a, 3a, 4a, 5a, and 6a), serum of animals infected with knocked DAS (1d, 2d, 3d, 4d, 5d, and 6d), and serum of animals infected with RAS

(1e, 2e, 3e, 4e, 5e, and 6e).

Figure 15 shows detection and quantification of *Giardia* cysts in feces samples of gerbils previously immunized with purified VSPs from different clone populations of wild type and/or transgenic *Giardia* trophozoites of the invention. Feces of immunized gerbils were monitored daily for a month using anti-CWP2 monoclonal antibodies to verify cyst release. Gerbils were infected with clone populations of WB9B10 or WB1267 trophozoites. Immunizations were carried out using purified VSPs from transgenic trophozoites DAS, RAS of the invention (and mixtures thereof); the animals were previously immunized with purified DAS (a), RAS (b) VSPs, or a mixture thereof (c); these animals were protected against subsequent infections by WB9B10 or WB1267 clones, control animals (d) or those immunized with intracellular protein (e) were not protected against subsequent infections. The figures represent mean value of 5 independent experiments;

Figure 16 shows photographs of gerbil small intestine morphology during the infection and the challenge; top panel shows small intestine of experimental animals: (a) gerbil intestine during primary infection with trophozoites expressing complete repertoire of VSPs (DAS) 15 days after inoculation; an increase of size in Peyer patches is observed (arrows) in comparison with control animals (b). (c) is the intestine during the challenge of gerbils immunized with purified VSPs of DAS trophozoites; lower panel shows experimental animals small intestine microscopic examination: (d) infected gerbils show

150

enlargement of Peyer patches and moderate infiltrative inflammation in mucosa and submucosa. Some *Giardia* trophozoites were seen in the intestine lumen (asterisks; 400X); (e) are non-infected control /no vaccinated gerbils (400X); (f) are vaccinated gerbils showing histologically normal intestinal mucosa (400X), insertions show a general small intestine morphology at 250X.

DETAILED DESCRIPTION

In the present application, trophozoite means a cell of a particular stage of a unicellular parasite, for example of a protozoan. To the effects of the present application, it is understood that the terms trophozoite, parasite, parasite cell, or protozoan have the same meaning and are interchangeable.

In the present application, the transgenic or modified parasite, trophozoite or protozoan of the invention may be a protozoan wherein the Dicer gene or the RdRP gene, or a mixture of transgenic protozoa thereof, have been silenced. These protozoa and interchangeably known in the present application as transgenic, transfected, or modified trophozoites, protozoa or parasites. When silenced, the trophozoite or protozoan Dicer gene of the invention may also be known as Dicer-AS or DAS. When silenced, the trophozoite or protozoan RdRP gene of the invention may also be known as RdRP-AS or RAS. When using a mixture of transgenic trophozoites or protozoa, they may be known as Dicer-AS + RdRP-AS ó DAS + RAS.

In the present application, trophozoites or protozoa expressing complete repertoire of variable surface proteins

150

may be any protozoan parasite or pathogen wherein the antigenic variation mechanism has been deactivated.

It is shown that VSPs expression regulation in *Giardia* includes a system comprising RNA-dependant RNA-polymerase, Dicer and Argonaute, components of the RNA interference machinery. Clones expressing a single surface antigen (protein) in surface, efficiently transcribe several VSP codifying genes, but only accumulate transcripts encoding the VSP to be expressed in the cell surface.

Detection of antisense RNAs corresponding to the silenced VSP genes and small RNAs from the silenced proteins silenciadas but not for the expressed VSP imply a RNA interference pathway in the antigenic variation regulation. Clearly, the silencing of Dicer enzyme and RNA-dependent - RNA polymerase leads to a change from single to multiple VSP expression in individual parasites.

Nuclear run assays were performed to determine if the VSP expression regulation is controlled at the transcripcional or post-transcripcional level. Then the existence of RNA was studied in trophozoites, at sense and antisense, codifying VSP by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and for the activity of enzymes involved in the synthesis and degradation of double-stranded (dsRNA) in higher eukaryotes, such as RNA-dependent RNA polymerase (RdRP), Dicer and Argonaute. The characterization involved cloning and expressing these genes as well as the analysis of small RNAs generated from VSPs codifying dsRNAs. Additionally, expression of different VSPs was evaluated after silencing the components of the *Giardia* RNA interference (RNAi) pathway.

Disruption of the antigenic variation mechanisms to

152

generate cells expressing complete repertoire of variable surface proteins in pathogen organisms has not been described yet. The complete repertoire expression of surface proteins in pathogenic organisms to generate parasites which may be used as vaccines, or complete repertoire purification of variable surface proteins for immunoprophylaxis of the diseases caused by these pathogens has not been possible yet.

Transcription of VSPs in *Giardia*:

Transcription of VSP genes was analyzed by nuclear run-on assays using RNA isolated from nuclei from WB9B10 clone trophozoites (Fig. 1a); said clone expresses only VSP9B10 (GenBank accession number AAK97086) on its surface. The results indicate that most of genes codifying VSPs were simultaneously transcribed. In contrast, when total RNAs extracted from two different *Giardia* clones (WB9B10 and WB1267) were incubated with an oligonucleotide used as probe corresponding to the conserved 3' end of VSP genes, only one transcript of the molecular size corresponding to the VSP expressed on the surface of these clones was detected (Fig. 1b). Additionally, very low-molecular-weight bands, suspected to be degradation products, were seen. Accumulation of only one VSP transcript was observed in different *Giardia* clones using VSP-specific probes (see Nash, T. E. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 352, 1369-1375 (1997)). This demonstrates that only one VSP transcript accumulates, where more than one VSP is transcribed in the parasite nucleus.

Post-transcriptional gene silencing in *Giardia* (PTGS):

(59)

A key step of PTGS is the production of dsRNAs that are homologous with the silenced gene. RT-PCR assays designed to specifically amplify sense or antisense VSP products revealed, after cloning and sequencing these fragments, that RNAs of both strands are present in trophozoites (Fig. 2). To evaluate the possible simultaneous transcription of sense and antisense RNAs for VSP-coding genes, a second nuclear run-on experiment was carried out using specific sense and antisense probes (Fig. 1c). In this assay, it was impossible to detect VSP-antisense RNAs, indicating that those molecules could be generated post-transcriptionally. Products generated by PCR from the WB9B10 clone using vsp9B10 and vsp1267 specific primers were also analyzed (Fig. 1d). The band corresponding to vsp9B10 was present in genomic DNA and sense complementary DNA but poorly in antisense cDNA. In contrast, vsp1267, which is not expressed on the surface of WB9B10 clone, could be amplified from genomic DNA, and equally amplified from both sense and antisense cDNAs. These results demonstrate that VSPs are transcribed simultaneously (further supporting the results of the nuclear run-on experiments), and that there is a low abundance of antisense VSP transcripts that are expressed and a presence of antisense VSPs RNAs that are transcribed but not translated.

Components of the *Giardia* RNAi machinery:

RdRP-mediated, unprimed production of dsRNAs from aberrant mRNAs and primed/unprimed production of dsRNA guided by short interfering RNAs (siRNAs) is necessary for triggering RNAi in some organisms. A *Giardia* homologue of

159

RdRP was identified. This RdRP gene encodes a basic protein of 155,257 Da that shares high homology with other eukaryotic RdRPs and greatly differs from the one encoded by the *Giardia* virus 16, indicating the protozoan nature of the identified gene.

Giardia RdRP transcription was verified by RT-PCR and northern blotting, and its localization assessed by haemagglutinin-tagged expression (HA). *Giardia* RdRP is probably associated to ribosomes present on the cytoplasmic side of the endoplasmic reticulum. Moreover, the enzyme is active in trophozoites, because it was capable of forming high-molecular-weight RNAs in vitro in the presence of homologous VSP RNAs (Fig. 3). A characteristic of RNAi is the degradation of dsRNA into 21-25-nucleotide siRNAs by the dsRNA-specific Dicer RNase. Previously, a *Giardia* Dicer homologue was identified, its structure solved, and the in vitro Dicer activity of the recombinant protein demonstrated (Macrae, I. J. et al. Science 311, 195-198 (2006)).

Using the *Drosophila* Dicer-1 sequence to search for homologous genes in the *Giardia* genome database, several clones with high degree of homology with the Dicer domains were identified. By PCR and later comparison with the genomic library, two independent ORF were observed, containing domains present in the known Dicer enzymes: an Argonaute protein with PIWI and PAZ domains (gAgo, GenBank access number AY142142), and bidented RNase III (gDicer, GenBank access number AY142144) containing a PAZ domain and a leucine zipper motif probably implied in the enzyme interaction with other components of RISC and RNA, respectively.

According to what is shown in figure 3, the Dicer enzyme expresses constitutively during the complete *Giardia* life cycle, with cytoplasmic location (Fig. 3). To evaluate the *Giardia* Dicer activity, *in vitro* essays were done, wherein radiolabeled dsRNA were exposed to a post-nuclear *Giardia* extract. The results (Fig. 4a), demonstrated that, regardless of the gene and the strand that is labeled (sense, antisense, or both), dsRNAs are processed into small RNA fragments of 20-30 nucleotides this processing is favored, as in higher eukaryotes, by the presence of ATP (Fig.4b). small RNAs obtained from those experiments were able to be cloned similar to siRNAs that have 5'-P and 3'-OH ends. Sequencing of those siRNAs indicated that they derived from the input VSP genes and that they are 22-25 nucleotides in length (Table 1).

Table 1:

VSP9B10 sense small RNAs	VSP9B10 antisense small RNAs
GTTTTGTTCTCGCGGGGTACTCGT (SEQ ID N° 1)	ACCCCCGCGAGAACAAAAGTCC (SEQ ID N° 57)
AGAGCGCGCGGCTCAATGCGCAG (SEQ ID N° 2)	TCCTGCCCATGCAATCTGGACGA (SEQ ID N° 58)
GATTGCATGGGCAGGAAAAGCAA (SEQ ID N° 3)	ATTGAGCCGCGCGCTCTGTTGCTTT (SEQ ID N° 59)
TCTCGATGTAACACAGGATTTGT (SEQ ID N° 4)	ATGCTTCCTCTGCGCAATTAGTGT (SEQ ID N° 60)
GGACAATGTGCAGACNNAGAAGG (SEQ ID N° 5)	CAATACAATTACCACCGATCAG (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)	GTAACAGCCGCCCTTGATACATGA (SEQ ID N° 64)
CGAAGCANCCAGCAGCCCGGACAG (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)	ACTTTTATCGTTCCTAACTGTTA (SEQ ID N° 68)
ACCGGCACCAAGACGTGCAAGAC (SEQ ID N° 13)	TGTGGGAGCGTAACACCGAGTGC (SEQ ID N° 69)
TGCGACGTGCGAGAAGGGCGCCGA (SEQ ID N° 14)	CACGCAGTACACGTGGCGGCCTT (SEQ ID N° 70)
GCCCGACCCNNAGTGCAACACCCCC (SEQ ID N° 15)	CACGCAGGAGGTGGCTGAGTCCT (SEQ ID N° 71)
GCTGCAAGACGTGCAGTGAGCCGA (SEQ ID N° 16)	GTGCCGGTGCACTCTTCTTCTGT (SEQ ID N° 72)
AGACAAGCAAGGAGGTGTGCNCA (SEQ ID N° 17)	TTGTTTGGCTGGACCTTCTTATT (SEQ ID N° 73)
ACGGTTGTGAGCACCTGGAAGGC (SEQ ID N° 18)	GCACTCACCGTCTCCGGGCACTTT (SEQ ID N° 74)
CCTGTGCCAAGTGCAATACCTCG (SEQ ID N° 19)	GCTTCTTCGTGCACCCGGTGCCC (SEQ ID N° 75)
AGCTACGAAGGAGAGGGCACGGGG (SEQ ID N° 20)	CTGGTGCCCTCGTAGTNNCCTNCC (SEQ ID N° 76)
TCGGCCCCGCACAGCCTCCTGCCAG (SEQ ID N° 21)	TGAGGACCTGCTTAGGCTCGCAG (SEQ ID N° 77)
ACGAAACGACCAANCTCCCTGGAA (SEQ ID N° 22)	CTTCTTGACNCACACGCCGTTCTC (SEQ ID N° 78)
TGAATAATGGCGCGCTCATCACTTG (SEQ ID N° 23)	TAGCAGCCCCCGTTTCATGCGGAA (SEQ ID N° 79)
GATGTAAGACGTGCACCAGCCAG (SEQ ID N° 24)	ACCTCCTCACAGACGCTCTTTCCA (SEQ ID N° 80)
TACTACCTGTCCAAAGAAAAGTG (SEQ ID N° 25)	GCTTGTATCCGTCGGCCGGAGTC (SEQ ID N° 81)
CCCCCAACCAACAATAAAGGGCC (SEQ ID N° 26)	CACTCGGAGCACCCAGTGGCGCA (SEQ ID N° 82)
ACCTCATACAGAACANNAACAGG (SEQ ID N° 27)	CACCTGGTGGCGTCGTCCGCATTG (SEQ ID N° 83)
GGGATCTCCGTCGCTGTCATCGC (SEQ ID N° 28)	ACAGCGNCGGAGATCCCCGCTATGG (SEQ ID N° 84)
TGCTGGTGGTTCATATGTAGNGG (SEQ ID N° 29)	AGAGGAAGCCCACGAGGCCCCC (SEQ ID N° 85)

VSP1267 sense small RNAs	VSP1267 antisense small RNAs
GCAAGCACTCTTGCAAGGAGCTT (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)
GCGGCTGATACCACGGATTTCCTGT (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)	CGTCGGCGCAGTTTTCCAAATAC (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)	
GTATCGCAGAGTGCACGGAANG (SEQ ID N° 44)	
GGCAGTGACAGCTAGCATAGCAG (SEQ ID N° 45)	
CCTTTGCGTGTGCGCCGAAACAG (SEQ ID N° 46)	
TAAACCAACGGAGTTTGCACTGCC (SEQ ID N° 47)	
CTATCAGGCTGAGAAGTTTCCTG (SEQ ID N° 48)	
GCAGGAAAGTGCACGACCTGTGCG (SEQ ID N° 49)	

VSPH7 sense small RNAs	VSPH7 antisense small RNAs
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)	CTTCCGTCTTNNAATAATCCTACC (SEQ ID N° 102)

N° 52)	ID N° 102)
ACAAAGGGAACATGCATTGCAGA (SEQ ID N° 53)	GAATCGTAACCCCGGTTGCGTCG (SEQ ID N° 103)
ACGCCGGATAANACCAACGGAGTT (SEQ ID N° 54)	ACTTAGCACAACCGGCCACACCC (SEQ ID N° 104)
TGTGCAANNNGATAACACTAANA (SEQ ID N° 55)	CTTATCAGCCGTACTACAGGTAAG (SEQ ID N° 105)
CTCGTCGGCTTCCTCTGCTGGTG (SEQ ID N° 56)	ACGGTGCTAGCCCTAGTTGTAGA (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)

The results show that a single *Giardia* Argonaute protein (*Giardia* AGO) could be identified, with PIWI and PAZ domains. Its expression was evaluated by northern blotting and its cellular localization determined by expressing a haemagglutinin tagged version of the protein. *Giardia* AGO localizes to the cytoplasm.

Regulation of VSP expression:

In the experiments, occurrence of multiple, homologous VSP transcripts could direct the generation of antisense RNAs by *Giardia* RdRP after transcription of several VSP genes took place. Moreover, the presence and activity of Dicer, and probably of AGO, suggests that an RNAi-like mechanism might be involved in regulation of the expression of surface antigenic variants in *Giardia*.

159

It was analyzed whether the *Giardia* PTGS machinery could discriminate the presence of different VSP mRNAs by mixing *Giardia* cytoplasmic extracts with one, two or three different VSP transcripts generated *in vitro*. When two or more labeled VSP mRNAs were incubated with trophozoite extracts containing the RNAi machinery, small VSP RNAs were produced, with an identical pattern to the Dicer activity assay products (compare Fig. 4a and Fig. 4c). In contrast, whenever a single transcript was incubated, no mRNA degradation took place. Additionally, if the unrelated genes *cwp2* (which encodes the cyst wall protein 2) or *gdh* (which encodes glutamate dehydrogenase) were added to a single radiolabeled VSP mRNA, no degradation to small RNAs was detected (Fig. 4c), indicating that the silencing machinery specifically processes homologue RNAs. Similar results were obtained when using cell extracts from different *Giardia* clones (for example, WBA6, WB1267 or GSH7): *vsp9B10* RNA was processed to small RNAs only when combined with other homologue VSP genes but not when it was the only VSP added to the reaction (Fig. 5). It is evident that the presence in the trophozoite extracts of endogenous siRNAs and various sense and antisense VSP RNAs certainly does not interfere with the silencing process. Because the VSP mRNAs used in these experiments were synthesized *in vitro*, it is obvious that the silencing mechanism can discriminate among homologous mRNAs in the absence of any possible post-transcriptional RNA modification. Considering that sense and antisense VSP transcripts were found in *Giardia* and that Dicer activity was demonstrated experimentally, small RNAs resulting from VSP dsRNA degradation were searched for.

Using partially a digested vsp9B10 RNA probe for northern blot assays in *Giardia* WB9B10 and WB1267 clones, small RNAs for VSPs that are not expressed (VSP1267 in this case) were detected, but not for the VSP9B10, which is expressed on the surface of the WB9B10 clone (Fig. 4d). These results raise the question of how a single VSP transcript bypasses this silencing process and is translated and expressed at the surface of the parasite.

To prove if the different VSP transcription concentration has a role in the antigenic change, the VSP expression *in vivo* was unbalanced by the cone expression of both vsp9B10 and vspH7 (GenBank register number, AAA18202), or constructions containing vsp9B10 antisense regions under control of a strong promotor such as de α -tubulin gene (Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. & Lujan, H. D. J. Biol. Chem. 277, 50557-50563 (2002) and Elmendorf, H. G. et al. Mol. Biochem. Parasitol. 113, 157-169 (2001)). VSPH7 showed variable expression, even under the pressure of the selection drug, and VSP9B10 also decreased over the time (Fig. 6). Besides, when VSP9B10 was knocked down, its expression on the parasite's surface diminished faster than in the control (Fig. 7). These results suggest that the promoter region of VSPs has little or no influence on VSP expression and, therefore, that a PTGS mechanism must be involved in *Giardia* antigenic variation.

Additional *in vitro* experiments in which the concentration of different VSP transcripts was unbalanced demonstrated that mRNA concentration may be relevant for a given VSP to circumvent the silencing machinery and be translated (Fig. 8). These results suggest that the *Giardia* extract is programmed to maintain a particular VSP

transcript unmodified, but can initiate RNA degradation than when a different VSP is in higher concentration (the processing of a given transcript may depend of the relative cytoplasmic concentration for each VSPs).

Silencing of *Giardia* RdRP, Dicer and AGO:

Since specific gene silencing is not possible in *Giardia* owing to its polyploidy and the presence of two nuclei, direct tests to show the involvement of the characterized RNAi components during antigenic variation by knocking down the expression of *Giardia* Dicer, RdRP and AGO by constitutive expression in trophozoites of part of their antisense transcripts were conducted. When a reduction of the expression of RdRP (RdRP-AS) or Dicer (Dicer-AS) took place (Fig. 9), trophozoites that express more than one VSP in their surface were generated, as determined by immunofluorescence assays using specific monoclonal antibodies (Fig. 10a and Table 2), flow cytometry (Figure 10b) and Western Blot (Fig. 10c). Silencing of *Giardia* AGO did not produce any viable clone, suggesting that this molecule is essential for the parasite. Trophozoites of the invention in which Dicer or RdRP were knocked down proliferate and encyst in culture as normal, and no deleterious effect on VSP regulation when a silencing or knocking procedure was applied (Table 2). From the teachings disclosed here, it is obvious Dicer, RdRP or both can be silenced or knocked out to obtain a modified protozoan, for example a modified *Plasmodium*, *Trypanosoma* protozoan, or any other protozoan showing an antigenic variation mechanism, with all of them within the scope of the present invention.

Table 2

Quantitative analysis of vsp expression in *Giardia* with knocked down or silenced RdRP (RdRP-AS) and Dicer (Dicer-AS)

VSP	None	Mock	<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

The table shows percentages of *Giardia* trophozoites expressing a particular VSP as determined by immunofluorescence assays using specific monoclonal antibodies (Mab) (for VSP9B10, Mab 9B10 was used; for VSP1267, 5C1; for VSPA6, 6A7; for VSPS1, 1B2; for VSPS2, 7B8; for VSPS7, 6F8) in WB9B10 trophozoites transfected with antisense constructs of *Giardias* genes codifying for RdRP and Dicer, such as the empty plasmid alone (mock) or not transfected (none) after 5 days culture. Goat anti-mouse immunoglobulins were used as control and showed no reaction. Data are presented as average ±SD of 3 independent experiments, each conducted in duplicate. Results indicate, judging from the addition of each percentage, that many different VSP may be expressed by a single trophozoite.

As can be observed in figure 10b, the clones showed clear single VSP expression patterns, while RdRP-AS and Dicer-AS trophozoites evidenced the expression of more than one VSP per trophozoite.

As shown in figure 10c, specific monoclonal antibody

163

anti-VSP9B10 only recognizes one band in the 9B10 clone and in modified trophozoites, while 12F1 monoclonal antibody of the invention reacts with many protein species in modified trophozoites, indicating that many VSPs may be expressed simultaneously in *Giardia* when the RNAi pathway has been interrupted or silenced.

In summary, a PTGS system (comprising at least RdRP and Dicer) is implicated in the regulation of surface antigen expression in *G. lamblia*. Because a humoral immune response in both experimental and natural *Giardia*-infected hosts coincides with the elimination of the original VSP, a functional role for cells and antibodies in the selection of phenotypic variants and on the course of infection was proposed. Given that parasite protection against specific immune responses relies on switching the expression between immunologically distinct surface proteins, one way in which hosts can prevent infections with a specific immunological response is by producing antibodies against all surface antigenic determinants. These results would demonstrate that the diminished regulation of the RNAi machinery components conducts to expression of more than one surface protein in trophozoites or protozoa, where these modified protozoa constitute a fundamental tool for the generation of a vaccine against important human or animal pathogens, or against any pathogenic microorganism having antigenic variability, for example *Plasmodium* or *Trypanosoma*.

It is evident that independently of the silencing procedure used, any protozoan modified in a way of expressing complete repertoire of surface proteins is enclosed in the scope of the present invention.

Likewise, the present invention encloses in its scope

any RdRP and/or Dicer silencing procedure in protozoa.

To determine if modified *Giardia* trophozoites expressing all VSPs repertoire could be used as vaccines, studies in an experimental gerbil giardiasis model were conducted. Firstly, trophozoites were generated WB from isolations expressing complete VSP repertoire by knocking down *Giardia* Dicer (DAS) or *Giardia* RdRP (RAS) expression as shown in the examples. Additionally, trophozoite populations expressing only surface VSP were obtained by limiting dilution in WB and GS cell isolations controlled by the use of Mab against given VSPs. Figure 11 shows that trophozoites where Dicer (Fig. 11a) or RdRP (Fig. 11b) were silenced express many VSPs on their surface, for example as seen in the direct immunofluorescence assays showing co-localization (yellow) of VSP9B10 (green) and VSP1267 (red). As can be seen, most trophozoites express more than one VSP on its surface. Percentage of cells expressing different VSPs on their surface was determined by the use of a panel of monoclonal antibodies directed against different VSP (Table 3)

Table 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

These percentages demonstrate that the cells are simultaneously expressed on a great amount of VSPs on their surface (> 100%). These modified trophozoites grow and encyst *in vitro* as wild-type cells, indicating that silencing of these enzymes does not interfere with other cell processes. In culture, trophozoites spontaneously switch from one VSP to another, and therefore, the populations of cells expressing a specific VSP on their surface are maintained exclusively in culture for 24 hs after cloning and selection, in order to insure population homogeneity. Fig. 11c shows that all trophozoites of a non-cloned culture of WB isolates may be labeled (after permeabilization) with the monoclonal antibody of the invention specific for the CRKGA cytoplasmic tail common to all known VSPs. Clonal populations of trophozoites expressing only one VSP (VSP9B10, VSP1267, VSPA6), as determined by indirect immunofluorescence assays contrasted with DAPI, may be observed in figure 1d-f (Mab 9B10, Mab 5C1, Mab 6E7, respectively). These *Giardia* populations were initially used to infect SPF gerbils. Infection was initiated orogastric trophozoite inoculation and cyst release, clearly indicating animal infection. *Giardia* cysts were assessed and identified in feces samples by immunofluorescence assays with a specific CWP2 monoclonal antibody (Mab 7D2). In addition, the amount of cysts per gram of feces generated by these animals was counted in order to determine infectivity and virulence of each modified type and wild type cell population. Fig. 12a shows that all populations could establish infection in healthy

gerbils. Onset of cyst appearance in feces samples and the amount of cysts varied slightly between different trophozoites used. Some animals were sacrificed and the intestinal content was recovered in order to verify the presence of trophozoites in small intestine. Infected animals showed some diarrhea episodes during the second infection week, and some of them lost weight. In order to prevent the likelihood of some chronically infected animals with small amount of trophozoites, half of the animals were treated with metronidazole to cure any non-detectable infection.

In order to determine if primary infection with trophozoites expressing a particular VSP (VSP9B10 and VSP1267) or with trophozoites expressing complete VSPs repertoire (DAS, RAS, DAS + RAS) protected the animals against later infections, the same animals were inoculated with a clone population of trophozoites expressing a specific VSP (VSP9B10 or VSP1267) 2 months after self-curing the primary infection. Figs. 12b and 12c show the results of cyst elimination in animals previously infected with WB9B10 or WB1267, respectively. Figs. 12d and 12e show the results of animals previously infected with DAS or RAS trophozoites, respectively. Results clearly indicate that (a) animals infected with trophozoites expressing one single VSP were refractory to a second infection with cells expressing the same VSP, suggesting the development of a strong immune response during the original infection against a given surface protein (Figs. 12a and 12b), (b) animals infected with cells expressing a particular VSP were easily re-infected with trophozoites expressing a different VSP, suggesting that, similarly to human

infection observations, re-infections are common after cure or medical treatment (Figs. 12b and 12c). (c) In contrast, animals infected with populations of trophozoites expressing complete VSPs repertoire were protected against later infections with clone populations expressing only one VSP on their surface (Figs. 12d and 12e). The same experimental challenges were performed 2, 4, 6 and 12 months after the original infection, with identical results (Tables 4 and 5).

Table 4: Challenge with WB9B10 clone trophozoites and percentage infected gerbils (between brackets).

Primary infection with	Number of gerbils	MNZ	Challenge on month 2 (% of infection)	Challenge on month 4 (% of infection)	Challenge on month 12 (% of infection)
None	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
None	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Yes	30- (0%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	29- 1+ (3.3%)	N/A	N/A
WB1267	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Yes	27- 3+ (10%)	30- (0%)	30- (0%)
Dicer-AS	90	No	29- 1k (0%)	28- 2k (0%)	27- 3k (0%)
RdRP-AS	90	Yes	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	Yes	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%)

Table 5: Challenge with WB1267 clone trophozoites and percentages of infected gerbils (between brackets).

Primary infection with	Number of gerbils	MNZ	Challenge on month 2 (% of infection)	Challenge on month 4 (% of infection)	Challenge on month 12 (% of infection)
None	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
None	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Yes	30- (0%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	29- 1+ (3.3%)	N/A	N/A
WBA6	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Yes	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	Yes	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	Yes	28- 2+ (6.6%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)
Dicer-AS	90	No	30-	30-	30-

& RdRP-AS			(0%)	(0%)	(0%)
--------------	--	--	------	------	------

Immunofluorescence assays carried out on feces of selected animals using a monoclonal antibody targeted against *Giardia* CWP2 clearly show cyst release infected animals and absence in those protected (Fig. 13). As can be observed, animals previously infected with WB9B10 clone were refractory to subsequent infection with the same clone (no cysts were found in feces) but they were infected with trophozoites expressing VSP1267 (a high number of cysts was detected). Gerbils previously infected with DAS or RAS trophozoites were protected against subsequent infections with WB9B10 or WB1267 clones (no cysts were found in samples of feces).

To determine if the cysts obtained in original infections (of unknown VSP of released trophozoites) could infect these animals, gerbils previously infected with populations DAS, RAS, and DAS + RAS were inoculated with a great amount of cysts. Table 6 results show that, like animals inoculated with particular trophozoites populations, the animals were refractory to infection, in comparison with control gerbils. Altogether, these results firmly show that an immune response to all VSPs is necessary to prevent generation of new infections.

Table 6: Challenge of cyst infection and percentage of infected gerbils (between brackets)

Primary infection	Number of	MNZ	Challenge on month 2	Challenge on month 4	Challenge on month 12
-------------------	-----------	-----	----------------------	----------------------	-----------------------

with	gerbils		(% of infection)	(% of infection)	(% of infection)
None	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
None	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	29+ 1k (96.6%)	N/A	N/A
WBA6	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Yes	30- (0%)	30- (0%)	30- (0%)
Dicer-AS	90	No	29- 1k (0%)	30- (0%)	29- 1k (0%)
RdRP-AS	90	Yes	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	Yes	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%)

In addition, symptoms observed during the primary infection disappeared during challenge infection. These results again indicate the need on immune response against all VSPs to prevent new infections.

On the other hand, serum and intestinal content was obtained from infected animals and from control animals, and they were placed *in vitro* with trophozoites expressing one or several VSPs. Serum or intestinal content of non-

121

infected animals had no effect on parasite morphology, viability, or motility (Fig. 14). In contrast, when a clone population of trophozoites expressing a single VSP was incubated with Mab targeted against said protein or with serum or intestinal content of animals infected with said, disattachment and la agglutination of the whole population occurred, indicating the presence of antibodies against the surface protein. Incubation with serum or intestinal content of gerbils infected with a different clone showed no significant effect (Fig. 14). When a clone population was faced serum or intestinal content from gerbils infected with silenced Dicer or RdRP cells, strong trophozoite agglutination occurred (Fig. 14). These results indicate that infected gerbils were able to develop strong immune response to VSPs present in trophozoites, and other antigens that might be present in the cell surfaces are irrelevant, no only for antibody production but also to confer protection against later infections.

In addition, fluids against trophozoites of isolated GS/M (assembly B). In this case, serum and intestinal content of infected animals with DAS and RAS trophozoites showed partial cell agglutination (between 30 and 40%), indicating that these assemblies may share some common epitopes in their VSPs.

On the other hand, hybridoma lines producing monoclonal antibodies against VSP cytoplasmic tail with the CRKGA amino acid sequence were obtained.

Gerbil immunization with purified VSP

The complete VSPs repertoire was purified from modified DAS and RAS trophozoites (see examples) using the

monoclonal antibody reacting against the cytoplasmic tail of 5 amino acids present in all VSPs. As control, a *Giardia* intracellular antigen GRP78/BiP was over-expressed and immunopurified. The animals were then immunized with these protein preparations, without adjuvant, by in three doses orogastric administration for 3 days. In all cases, vaccination did not cause symptoms of disease, indicating that VSPs alone are not toxic for the animals. After 2 months, the animals were inoculated with parasites expressing particular VSPs. The animal infection was monitored by counting cysts in feces and in some cases sacrificing animals in order to observe the presence of trophozoites in small intestine. Oral immunization with complete VSPs repertoire generates strong immune response, which prevents animal infection; similar results were observed during primary infections. In addition, control animals inoculated with vehicle or GPR78/BiP promptly were infected with clone trophozoite populations (Fig. 15). Individual purified VSPs used as immunogens showed results identical to those observed in infection experiments described above. Protection generated by preparation of complete VSPs repertoire remained for at least a year (Tables 7, 8 and 9).

Table 7: Challenge with WB9B10 clone trophozoites and percentage of infected gerbils (between brackets) after immunization with purified VSPs.

Immunization with VSPs or Bip	Number of gerbils	MNZ	Challenge on month 2 (% of infection)	Challenge on month 4 (% of infection)	Challenge on month 12 (% of infection)
None	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A

None	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Yes	30- (0%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	28- 2+ (6.6%)	N/A	N/A
WB1267	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Yes	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	Yes	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	Yes	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	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
BiP	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A

Table 8: Challenge with clone WB1267 trophozoites and percentage of infected gerbils (between brackets) after immunization with purified VSPs.

Immunization with VSPs or BiP	Number of gerbils	MNZ	Challenge on month 2 (% of infection)	Challenge on month 4 (% of infection)	Challenge on month 12 (% of infection)
None	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
None	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Yes	30+	N/A	N/A

			(100%)		
WB9B10	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Yes	30- (0%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	29- 1+ (3.3%)	N/A	N/A
WBA6	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Yes	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	Yes	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	Yes	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	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
BiP	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A

Table 9: Challenge of cyst infection and percentage of infected gerbils (between brackets)

Immunization with VSPs or BiP	Number of gerbils	MNZ	Challenge on month 2 (% of infection)	Challenge on month 4 (% of infection)	Challenge on month 12 (% of infection)
None	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
None	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Yes	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Yes	30+	N/A	N/A

			(100%)		
WB1267	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Yes	29+ 1- (96.6%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Yes	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	Yes	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	Yes	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

Interestingly, it must be pointed out that although *Giardia* infection sometimes shows no inflammation, infested gerbil intestines showed increase of size in Peyer patches and in infiltrating neutrophils, mast cells, and lymphocytes in intestinal epithelia (Fig. 16). Gross and microscopic alterations of higher small intestine were not evident in immunized gerbils (Fig. 16).

These results indicate that both initial infection and immunization with VSP preparations can confer immune protection to animals, capable to prevent later infection with *Giardia* cysts or clones obtained from infected person's feces samples.

In all cases, N/A means not applicable, d means

sacrificed animals to detect intestinal parasites.

Modified protozoa and the vaccines of the invention increase the immunity of any mammal against infections produced by protozoa having antigenic variation mechanisms to overcome host immune response. Evidently, parasites may be any type of protozoa having said mechanism, for example *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Babesia*, etc.

Both wild type and modified or silenced protozoa generate an infection with peak cyst excretion on day 15 and self-resolved on day 30.

Animals treated or not with metronidazole showed similar protection pattern to subsequent infections.

Cysts generated by both types of trophozoites, wild and modified (silenced) are infective for native gerbils.

Gerbils infected with live *Giardia* expressing only one VSP on its surface are protected against later infections by the same clone.

Gerbils infected with live *Giardia* expressing only one VSP on its surface are not protected against later infections of different clones.

Gerbils infected with live *Giardia* trophozoites expressing complete VSPs repertoire, for example by silencing Dicer and/or RdRP, are protected against later infection with different clone populations.

Gerbils infected with live *Giardia* trophozoites expressing complete VSPs repertoire, for example by silencing Dicer and/or RdRP, are protected against later infection with cysts obtained from human feces samples.

Gerbils immunized with dead *Giardia* trophozoites expressing complete VSPs repertoire, for example by

17x

silencing Dicer and/orRdRP, are protected against later infection with different clone populations.

Gerbils immunized with purified VSPs are protected against later infection with different clone populations.

Gerbils immunized with a purified intracellular antigen are not protected against a later infection.

Primary infection with cells expressing complete VSPs repertoire generates an immunologic response protecting animals against later infections (protection between 87 and 100%).

No vaccine formulation has shown toxic effects on animals.

This invention is better illustrated by the following examples, which must not be construed as a limitation to its scope. On the contrary, it must be clearly understood that other of its embodiments, modifications and equivalents may be referred to, which after reading the present description, may be suggested to those skilled in the art without parting from the spirit of the present invention and/or scope of the enclosed claims.

Examples

Example 1: Parasite culture and cloning: *Giardia* trophozoites were cultured in TYI-33 medium supplemented with adult bovine serum and bovine bile (Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., Bowers, B. & Nash, T. E. J. Biol. Chem. 270, 29307-29313 (1995). Continuous cloning of trophozoites was carried out by limiting dilution and selection based on immunofluorescence assays using the corresponding anti-VSP monoclonal antibody. Encystation was carried out as previously reported (Lujan, H. D., Mowatt,

M. R., Conrad, J. T., Bowers, B. & Nash, T. E. I, J. Biol. Chem. 270, 29307-29313 (1995). *Giardia lamblia* trophozoites of WB clone strains 9B10, 1267 and A6, and GS clone strain H7 were used.

PCR: Total *G. lamblia* trophozoite DNA was isolated as described in (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).

a: sense primers 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) and S4 (5'-CGA TCA TGA CGG GCT TCT-3') (SEQ ID N° 116). Antisense primers R1 (5'-CCB ACG AGG CCY CCS ACG AC-3') (SEQ ID N° 117) and R2 (5'-CGC CTT CCC KCK RCA KAY GA-3 ') (SEQ ID N° 118). PCR conditions were: denaturalization at 94°C for 40 s, hybridization at 53°C for 40 s and elongation at 72°C for 90 s, using Taq polymerase High Fidelity (Invitrogen) for a total of 35 cycles.

RT-PCR. VSP sense primers (S1-S4) were added to 1 µg of total RNA and heated at 70°C for 5 min. Reverse transcription reaction samples (2 microliters) were amplified using all possible primer sense/antisense combinations listed above or using specific vsp1267 and vsp9B10 primers (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)). RT-PCR products were

analyzed by electrophoresis and purified by Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen). To study expression of different genes during *Giardia* trophozoite differentiation or in silencing experiments, RT-PCR was used with the following specific pairs of primers: 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); γ CWP1 differential expression control (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), and GDH constitutive expression (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). Products of these reactions were also isolated, labeled, and used as probes for Northern blot, as indicated belowe.

Northern Hybridation: Total RNA (10-15 μ g) was fractionated on a 1.2% agarose-formaldehyde gel, transferred to a Hybond N+ (GE) and fixed with a UV Crosslinker (UVP) by standard procedures. The conserved C-terminal end fragment (anti-sense primer R2) was radioactively labeled with T4 polynucleotide kinase using γ -[32P]-ATP (5'-End Labelling System Promega). *grdrp*, as well as other DNA fragments, were uniformly labeled by random priming (Prime-A-Gene Labelling System Promega).

Nuclear run-on analysis: cells were resuspended in 1 ml of ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.4, 1.5 mM MgCl₂,

0.14 M NaCl, and CompleteTM protease inhibitor cocktail) at 4°C; 2.25 µl of Nonidet P-40 were added and the suspension was incubated for 15 min on ice. Nuclei were recovered by centrifugation at 2,000g for 1 min and washed twice in 1 ml of ice-cold nuclei wash buffer (20 mM Tris- HCl pH 8.4, 140 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20% (V/V) glycerol and 14mM β-mercaptoethanol) at 4°C. Then, nuclei were re-suspended in 50 µl of labeling buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4 at 4° C), 140 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20% (V/V) glycerol and 14 mM β-mercaptoethanol, 1 mM each of ATP, GTP, and CTP, 10 mM phosphocreatine, 100 µg/ml phosphocreatine kinase and 0.1 µM [32P]UTP, 5000 µCi/ml) and incubated 2 for 40 min at 37°C. VSP products generated by RT-PCR and 3 µg of *vsp9B10*, *vsp1267*, *vspH7*, and *vspA6* cloned into p-GEM T-easy vector (Promega) were transferred onto Hybond N+ using a slot blot apparatus (BioRad). Additionally, sense and antisense transcripts generated in the *in vitro* transcription reaction were also blotted under similar conditions.

Detection of small RNA: The detection of small RNA was performed as previously reported (35. Hutvagner, G., Mlynarova, L. & Nap, J. P. Detailed, RNA 6, 1445-1454 (2000). Briefly, 15 µg of *G. lamblia* total RNA was denatured for 10 min at 65°C in 1X loading buffer, and loaded on a 15% polyacrylamide/7 M urea gel. After electrophoretic separation, RNA was electroblotted in 0.5X Trisborate- EDTA buffer (pH 8) onto a Hybond N+ membrane for 45 min at 100 V in TBE 0.5X, and finally UV fixed. [32P]-labeled riboprobes were transcribed *in vitro* by T7 or SP6 RNA polymerase using VSPs genes 9B10, 1267 and H7 cloned into p-GEM T-easy vector (Promega). Labeled RNA was partially hydrolyzed during 1 h by incubation at 60°C in

the presence of 80 mM NaHCO₃ and 160 mM Na₂CO₃. Each hydrolyzed VSP transcript was hybridized in 25% formamide, 0.5 M NaCl, 25 mM EDTA, 1X Denhardt's solution and 150 µg/ml denatured salmon sperm DNA and incubated at 42°C overnight. After hybridization the membranes were washed twice in 2X SSC, 0.5% SDS for 30 min and once in 0.5X SSC, 0.5% SDS for 15 min at 45°C. Subsequently, each reverse hydrolyzed vsp transcript was hybridized in the same way and the membranes signals were detected by exposure to Kodak XAR films at -70°C or a phosphorimager (Amersham). Length standards were from a commercial source (Decade™ RNA markers, Ambion).

Endonuclease activity: Dicer activity was analyzed by incubating dsRNA molecules with cytoplasmic extracts of *Giardia* clone WB9B10, WBA6, or WB1267. vsp9B10, vsp1267, vspH7, cwp2, and gdh genes cloned into p-GEM T-easy vector (Promega) were transcribed *in vitro* to produce full-length sense [32P]-labeled RNA probes, which were purified and tested for the absence of small RNA contaminants. Pure or mixed vsp transcripts were incubated for 1 h at 37°C with *Giardia* extracts. dsRNA was produced by annealing equal amounts *in vitro* transcribed sense and antisense RNAs (vsp1267, vsp9B10, cwp2 and gdh), labeled or not with [32P] UTP. These dsRNAs were re-suspended in Tris-HCl (pH 7.5)/20mM NaCl, heated at 95°C for 1 min and cooled down at room temperature for 12 h. Cell lysates were generated from 1 x 10⁷-1 x 10⁸ cells, which were re-suspended in 500 µl of buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM Sucrose, and containing Complete™ protease inhibitor cocktail), sonicated, and centrifuged at 2,000g for 15 min to separate unbroken cells and nuclei, and then incubated with dsRNA at 37°C for 1 h. Then, total RNA was extracted,

02

electrophoresed, and transferred as indicated above for small RNA. Selection of low molecular weight RNAs was made by filtration through Microcon-100 filter units. The filtrate, containing small RNAs, was precipitated with 300 mM NaCl/0.6 ml of isopropanol, loaded on a 20% polyacrylamide/7 M urea gel, and electrophoresed. To determine the effects of ATP on the endonuclease activity, ATP was depleted by incubating *Giardia* cytoplasmic extracts with 2 mM glucose/0.1 U/ μ l hexokinase (Sigma) for 30 min at 35 °C. Then, [³²P]UTP-labeled vsp1267 dsRNA was added to the lysate in the presence or absence of 10 mM phosphocreatine, 100 μ g/ml phosphocreatine kinase, or both, for 1 or 3 h at 37°C. Total RNA was extracted using Trizol and the RNA sample was RNA samples were enriched for low molecular weight RNAs using the Microcon-100 filtration unit as described above. Samples were electrophoresed and products detected as described above. The products of dsRNA processing using *Giardia* extracts were gel purified, ligated, amplified, cloned, and sequenced (Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K. & Ullu, E. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95, 14687-14692 (1998)).

To determine the nature of the small RNAs, they were treated with alkaline phosphatase (to demonstrate the presence of 5' phosphates) or subjected to periodate oxidation followed by β -elimination (to confirm the presence of 3' hydroxyls), as described (Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. *Genes Dev* 15, 188-200 (2001)).

RdRP cloning, sequencing, and activity: For RT-PCR, cDNA synthesis was performed using total RNA extracted from trophozoites and oligo(dT)20 as primers. Alignment of the

known RdRP from several organisms, in conjunction with codon usage knowledge in *Giardia*, allowed the design of moderately degenerated primers: 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 and SEQ ID N° 134; and RdRP_R: (5'-TCA CC (A / G) TCC AGG TC (G / A) CTG CC) -3 ') SEQ ID N° 135 and SEQ ID N° 136. The PCR product generated using those oligonucleotides was electrophoresed, gel purified, radiolabeled by random priming, and used to screen a *G. lamblia* cDNA library in λ gt22a as reported (Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. *Genes Dev* **15**, 188-200 (2001)). λ ZAP gDNA library screening was performed as described (Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. *Genes Dev* **15**, 188-200 (2001)). DNA fragments were cloned into pBlueScript SKII+ and submitted for automatic sequencing. 3' 5'-RACE was performed using a commercial kit from Invitrogen and primers 5'-CTT GTG CAT AGT AAA CAA AG-3 ' SEQ ID N° 137 and 5'-CAA ATG GTC GAT GCT GGG-3' SEQ ID N° 138. For gRdRP activity *in vitro*, HA-tagged RdRP was purified from transfected trophozoites by affinity using antiHA-sepharose (Sigma). Enzyme activity was assayed at 35°C for 60 min in 20 μ l reaction mixture containing 50 mM Hepes pH 7.6, 20 mM ammonium acetate, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 1 mM each of four ribonucleoside triphosphate (including [α -³²P] UTP), and 1 u/ μ l RNasin, plus the addition of ssRNA substrates (250 μ g/ml) prepared by *in vitro* transcription as described, with or without the presence of VSP specific primers. Reaction products were analyzed by agarose gel electrophoresis followed by transfer and autoradiography.

Transfection and immunofluorescence assays: Plasmid

PTubPac37 was modified to introduce the entire gRdRP, gDicer, gAgo, and VSPH7 coding regions and, when corresponding, the Influenza Haemagglutinin epitope (HA) before the TAA stop codon (Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. & Lujan, H. D. J. Biol. Chem. 277, 50557-50563 (2002). gAgo coding region was introduced into the plasmid **pTubNterPac** in which the gene is introduced after the Haemagglutinin coding region to avoid possible interference of the HA tag with the PIWI domain. This plasmid is a modification of the **pTubHAPac** with the substitution of the original multiple cloning site by a new one (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 transfection of trophozoites of *G. lamblia* was done by electroporation as already described (Yee, J. & Nash, T. E. Proc. Natl Acad. Sci. USA 92, 5615-5619 (1995). Transfection of *G. lamblia* trophozoites was done by electroporation as previously described³⁸. Cells were incubated on ice for 10 min, cultured in growth medium overnight at 37°C and selected as puromycin-resistant cells. Indirect immunofluorescence assays using an anti-HA monoclonal antibody (Sigma) was performed on non-encysting trophozoites fifteen days after transfection as described (Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. & Lujan, H. D. J. Biol. Chem. 277, 50557-50563 (2002). Previously reported anti-VSP monoclonal antibodies were used to test the expression on different VSP on fixed trophozoites as described elsewhere (Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. & Lujan, H. D. J. Biol. Chem. 277, 50557-50563 (2002). Novel monoclonal antibodies generated in this study were used

185

similarly. Confocal images were collected using a Zeiss LSM5 Pascal laserscanning confocal microscope equipped with an argon/helium/neon laser and a X100 (numerical aperture = 1.4) oil immersion objective (Zeiss Plan-Apochromat). Single confocal sections of 0.3 μ m were taken parallel to the coverslip (z sections). Images were acquired using a Zeiss charge-coupled device camera and processed with LSM and Adobe Photoshop software. For functional analysis of gRdRP, gDicer, and gAgo, and VSP9B10 specific sense primers containing an *Eco* RV site and antisense primers with an *Nco* I site were used to amplify by PCR the a portion of the ORF of each gene. PCR products were purified, restricted, and cloned into the vector **pTubHAPac**. In this manner, genes were inversely inserted inside **pTubHAPac**, giving the antisense construct that was then used for inhibition of expression (Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. & Lujan, H. D. J. Biol. Chem. 277, 50557-50563 (2002). Sequences were always confirmed by dye terminator cycle sequencing. Gene knock-downs were confirmed by RT-PCR and qRT-PCR using the gene specific primers indicated above on total RNA extracted from transfected trophozoites and compared to control of cells transfected with vector only or with the same vector expressing an HA-tagged version of each molecule.

Example 2:

Production of monoclonal antibodies to the VSPs 5 amino acid of and to individual VSPs: Six week-old female BALB/c mice were immunized subcutaneously with either 200 mg of (a) an HPLC purified preparation of NH₂-CRGKA-COOH peptide conjugated to KLH using the SMBS cross-linker, or

186

(b) the synthetic multiple antigen peptide [NH₂-CRGKA]8-[K]7-bAla-OH (both from Biosynthesis, Inc.), or protein extract of cultured trophozoites derived from the WB isolate, emulsified in Sigma adjuvant system (Sigma). Mice were boosted subcutaneously after 21 days with 200 mg of the same preparation, and 20 days later boosted intravenously with 100 mg of the antigen preparation. Three days later, the mice were euthanized and the spleen cells used for fusion to NSO myeloma cells. Hybridomas secreting antibodies were screened by ELISA using the original peptides and by indirect immunofluorescence using nonencysting and encysting trophozoites (Jambhekar, A. D. et al. RNA 13, 625-642 (2007) and Aggarwal, A., Merritt, J. W., Jr. & Nash, T. E. Cysteinerich; *Mol Biochem Parasitol* 32, 39-47 (1989)). Monoclonal antibodies against VSP were generated using entire trophozoites as previously reported (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)).

DNA methylation: from *G. lamblia* clone 1267 was purified by extraction with phenol and chloroform/isoamyl alcohol (24/1 % v/v), incubated with ARNase (Roche) to eliminated ARN contamination, and precipitated with ethanol. The presence of methyl deoxyribonucleosides was determined by high-performance liquid chromatography HPLC (45, 46). The separation of deoxyribonucleosides was performed on a Phenomenex Luna 5 µm C18, 4.6 x 150 mm. The method was calibrated based on the absorption of standard deoxyribonucleosides of known concentration.

Example 3: Preparation of the different vaccines and protection assays

1. *Parasites: Giardia lamblia* WC strain (ATCC 30957) was isolated from a symptomatic patient believed to have acquired giardiasis in Afghanistan (Antigenic analysis of *Giardia lamblia* from Afghanistan, Puerto Rico, Ecuador, and Oregon. Smith PD, Gillin FD Kaushal NA and Nash TE. Infect. Immun. 1982 May; 36(2): 714-9), and the GS/M strain was isolated from a symptomatic patient from USA (Antigenic analysis of *Giardia lamblia* from Afghanistan, Puerto Rico, Ecuador, and Oregon. Smith PD, Gillin FD Kaushal NA and Nash TE. Infect. Immun. 1982 May; 36(2): 714-9), clones derived from WB strain, and the transgenic trophozoites were cultured at 37°C in TYI-S-33 medium supplemented with 20% adult serum (Invitrogen), bovine bile (Sigma), and a antibiotic/antimycotic solution (Invitrogen) in 12 ml borosilicate glass tuber with threaded cap (Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clark CG, Diamond LS. Clin Microbiol Rev. 2002 Jul; 15(3):329-41). *Giardia* clones expressing different surface proteins were obtained by limiting dilution in 96-well culture plates (DeltaLabs) in an anaerobic chamber (BD) and selected by immunofluorescence assays using specific monoclonal antibodies (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). Reactive clones were amplified overnight in culture medium and homogeneity was verified before use. WB 1267 (Mab 5C1), 9B10 (Mab 9B10), A6 (Mab 6E7) and GS/M/H7 (Mab G10/4) clones were used in control experiments and in infections

(Nash, T. Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. *Parasitol Today* 8, 229-234 (1992).

Generation of transgenic trophozoites expressing complete VSPs repertoire: Complementary sequences to the genes codifying for *Giardia* RdRP and Dicer enzymes were cloned in pTubHA.pac plasmid (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. This allowed for constitutive and stable gene expression in *G. lamblia* trophozoites due to the presence of α -tubulin promotor and selection with the antibiotic puromycin. Genes codifying Dicer and RdRP enzymes were amplified by PCR from WB/9B10 clone cDNA using Platinum HiFi Taq DNA polymerase (Invitrogen), using oligonucleotide probes containing NcoI and EcoRV restriction sites and then cloning the vector. Primers were 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, and RAR: 5'-CCA CCA TGG TCG CTA CCT TAG CAT CAT CC-3' SEQ ID N° 144. Constructions were verified by digestion with restriction enzymes and later sequencing. Enzyme silencing verification was carried out by qRT-PCR as described above.

Giardia lamblia transfection: *Giardia* transfection was performed by electroporation, essentially as reported (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). Briefly, WB/9B10 clone trophozoite cultures growing until confluence in 12-ml tubes (about 10^7 cells) were re-suspended in 0,3 ml complete TYI-S-33 medium, in 0,4 cm plates. Then, 10-15µg plasmid were added to a final volume of 100 µl. The mixture was incubated for 10 minutes on ice. Cells were electroporated at 350V, 1000µF and 700Ω in a BTX electroporator. After incubation on ice for 10 minutes, the cells were transferred to a tube containing a 12 ml complete medium and incubated overnight at 37°C in anaerobiosis. Next day, the medium was complemented with puromycin and trophozoites were incubated for 7-10 days at 37°C. To obtain clone cell lines, limiting dilution was performed in 96 well plates.

Confocal immunofluorescence and microscopy: Trophozoites were detached from the tubes by cooling down for 20 minutes in ice. The cells were recovered and re-suspended in growth medium, applied on glass slide p se incubated at 37°C in humid camera for 1 hour to allow for trophozoites re-adhering. Preparations were washed with warm medium three times, plus two washings in warm PBS. Then, cells were turned permeable by fixation with 1:1 acetone/methanol for 30 minutes at -20°C and blocked in 1X PBS/0.05% Tween 20, BSA 2,5% for 30 min. Cells were firstly incubated with Mab against different VSPs diluted in 1X PBS/0.05 Tween 20, BAS 2,5% for 1 hour at room temperature. Monoclonal antibodies targeted against different VSPs were: 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). After incubation with the appropriate monoclonal antibody, the slides were washed twice with 1x PBS/0.05 Tween 20, and then incubated with a second goat anti-mouse immunoglobuline antibody labeled with FITC or TRITC in a 1/200 dilution for 1 hour in blocking solution. Nuclei were contrasted with DAPI. Confocal images were obtained by a laser confocal microscope LSM5 Zeiss Pascal equipped with a argon/helium/neon laser, and an oil immersion objective X100 (numerical aperture = 1,4) (Zeiss Plan Apochromat). 0.3 micron confocal sections were taken parallel to the cover slide (sections z). Images were obtained using a Zeiss camera by the device and processed with LSM and Adobe Photoshop software. The percentage of cells expressing a particular VSPs was computed by counting 500 cells in triplicate experiments or by flow cytometry.

Production of monoclonal antibodies against 5 amino acid VSPs tail: Production of monoclonal antibodies to the 5-amino acid VSPs tail was carried out as described above in example 2.

2. *Polyacrylamide gel electrophoresis and Western Blotting:* Protein trophozoite extract were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blot as reported (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).

Animals: All procedures carried out in animals were performed in accordance with protocols approved by the Institution Commission of Care and Use of Animals of Universidad Católica de Córdoba and the immunization guideline was well tolerated by all animals. Male endogenously breed gerbils, 6-weeks old pathogen free specimens (SPF) (*Meriones unguiculatus*) were obtained from Bioterio de animales de investigación of Universidad Católica de Córdoba and individually housed in an air-conditioned (18-22 °C, 40-50 % humidity) biohazard rack (Techniplast) with a 12-hour-light, 12-hour-dark cycle. They were given autoclaved food and sterile water supplemented with a mixture of filter-sterilized vitamin solution *ad libitum*. In this study, only animals born in our premises were used, in order to assure that they were never infected with the *Giardia* parasite or any other related. All animals were kept under SPF laboratory conditions according to the rules and rulings of the Argentine Council of Animal Care and international animal attention rules. Before infection, gerbils were tested for negativity of serum antibodies against *Giardia lamblia* or proteins of *Giardia* by ELISA using a preparation of total proteins extracted from trophozoites and cysts. After infections, some control groups of gerbils were orally treated with 20 mg Metronidazole for 3 days, 10 days antes before challenges to rule out any possible presence of low

level of intestinal *Giardia*

Elimination of protozoa parasites by treatment with metronidazole: To initiate treatment, the animals were placed in sterile cages with filtered air; water and food were sterilized in autoclave. A 100 mg/ml Metronidazole working solution was prepared. 500 µl of this solution was given orally to the animals in one daily dose for three consecutive days. The animals did not receive antibiotics the following four days. Treatment continued for dos days with 500 µl of metronidazole working solution. Treatment was complemented by the addition of 2 ml metronidazole in 400 ml of autoclaved drinking water, which was the only water the animals could drink during the whole treatment (animals ingest this diluted metronidazole solution for nine days). Feces were collected daily during the whole treatment and microscopic control by immunofluorescence assays were done with monoclonal antibody 7D2 (cyst wall anti-protein 2? (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) every day in order to determine the presence of cysts. During the treatment, the normal animal flora suffered increase of yeasts, and recovered its normal status few days after finishing treatment.

3. *Infections:* Infections were induced in gerbils by orogastric inoculation of 2×10^5 trophozoites or cysts resuspended in 0.5 ml of phosphate-buffered saline (PBS).

193

Some control animals received 0.5 ml of PBS by the same route. Fresh cysts collected from infected gerbils were used in order to prevent rapid loss of viability and infectivity produced in samples obtained from infected patients. Fecal collection from infected gerbils was performed daily from day 0 to day 30. Cysts or trophozoites were identified visually by light microscopy or by immunofluorescence assays using cyst (mAb 7D2) or trophozoite-specific antigens (BIP; Mab 9C9).

4. Periodically, randomly selected gerbils were sacrificed, the small intestines were isolated, slit opened longitudinally and suspended in culture medium at 4 °C for 30 min. The supernatants were collected and examined for *Giardia* trophozoites by light and fluorescence microscopy or placed in culture medium up to six days as reported (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)).

Giardia cysts excreted by gerbils were quantified by collecting stool pellets from individually housed animals over a 24-hour period. The stool samples were weighted, resuspended in 2 ml of PBS, and filtered through 3 layers of cheesecloth. Filtrate was centrifuged at 250 g during 10 min in a refrigerated centrifuge (Beckman). The filtrate was centrifuged at 250g for 10 min in a refrigerated centrifuge (Beckman) at 4 °C. After 3 washes, the pellet was suspended in 2 ml of PBS; cysts stained with FITC-labeled 7D2 mAb, and counted in a hemacytometer. Gerbils were deemed not infected if no cyst was found in feces or if no trophozoite was detected after 6 days culture.

Purification of VSPs from Dicer-AS and RDRP-AS transgenic trophozoites: Complete repertoire of VSPs expressed in these transgenic trophozoites generates as described were purified by immunoaffinity using Mab 12F1 of the invention generates against the 5 amino acids of the conserved VSP tail. Protein A-Sepharose (Amersham) was used to isolate the mouse immunoglobulins from ascites fluid produced by IP injection of a culture of hybridoma cells. Purified mAb was linked to magnetic beads (Dynal) and utilized to purify VSPs from plasma membrane-containing microsomal fractions of trophozoites. Purified VSPs were re-suspended in PBS containing 0.01 % Tween 20, quantified, and used to immunize gerbils orally. Individual VSPs were purified by the same methodology using specific mAbs.

Purification of Giardia GRP78/BiP: *G. lamblia* trophozoites isolated from 9B10 WB clone were transfected with plasmid pTubHA.pac containing the complete length of *Giardia* endoplasmic reticulum chaperone BiP/GRP78 (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) and three copies of this epitope was labeled with Haemagglutinin (HA-BIP). Transgenic trophozoites were lysated with buffer RIPA and the isolated BIP protein using anti-HA immunopurification kit (Sigma).

Oral immunization: The animals were immunized with three successive oral administrations of 200 µg parasite proteins suspended in sterile PBS/0.01% Tween 20, with

three days difference between each administration. The same amount of proteins was administered to the gerbils when BIP, membrane preparations, or purified VSPs were used as immunogens.

Blood samples: Blood samples were collected after the first day of infection or immunization to detect the presence of circulating antibodies as described below. Gerbils were anesthetized with ether and blood was taken from the orbital plexus or by intracardial puncture. Serum was collected by blood sample centrifugation at 800 xg for 15 min and stored at -70°C until use. Gerbils were sacrificed with gaseous carbon dioxide.

5. Intestinal contents: Small intestine secretions of infected, not infected and immunized gerbils were collected as in mice (Heyworth, M.F. Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. *J Parasitol* **78**, 73-76 (1992)).

In summary, gerbils fasted during a day with access to water and then sacrificed. The small intestine was excised from duodenum to cecum and its content was aspirated with a syringe and separated. En some cases, the intestinal content was centrifuged at 5,000 xg at 4°C to separate cells, rests, and bacteria. En some experiments, the small intestine lumen was washed five times with 3 ml of cold PBS and centrifuged as described above. Supernatants were sterilized by filtration and stored at -70°C until use.

Agglutination assays: Assays were performed in 96-well plain bottom plates. About 5×10^5 trophozoites were incubated at 4°C for 1 h with several dilutions of animal

intestinal secretions, serum, or ascetic fluid containing specific antibodies against VSPs (all heat-inactivated) in TYI-S-33 medium without adult bovine serum. They were mixed and trophozoite agglutination was assayed by microscopy. Linking of antibodies to the parasite surface was demonstrated with goat anti-mice immunoglobulins labeled TRITC.

LIST OF SEQUENCES

<110> Conicet

Luján, Hugo

<120> Modified protozoan expressing at least two dos
variable surface proteins (VSP), a vaccine comprising it,
and procedures, uses and methods thereof

<130> Conicet

<160> 144

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 1

gtttttgttct cgcgggggta ctcgt 25

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 2

agagcgcgcg gctcaatgcg cag 23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 3

gattgcatgg gcaggaaaag caa 23

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 4

tctc gatgta 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
<400> 5

ggacaatgtg cagacnnaga agg

23

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 6

aaagatggct ccggaggcga taca

24

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 7

cagacctgtg gacagtgcgc cgag

24

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 8

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

<400> 9

cgaagcanc cagcagcccg gacag

25

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 10

gcaaggatac ttcgtgccgc cgg

23

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 11

accaatcggc cataccatgc ggag

24

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 12

acgataaaaa gtacaagggc gtgct

25

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 13

accggcacca agacgtgcaa gac

23

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 14

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

gccccgaccn nagtgcaaca ccccc

25

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 16

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

agacaagcaa ggaggtgtgc nca

23

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 18

acggttgtga gcacctggaa ggc

23

<210> 19

<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 19
cctgtgccaa gtgcaatacc tcg

23

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 20
agctacgaag gagagggcac gggg

24

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis

<400> 21
tcggcccgca cagcctcctg ccag

24

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 22
acgaaacgac caanctcctt ggaa

24

<210> 23
<211> 25
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 23
tgaataatgg cgcgctcatc acttg 25

<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 24
gatgtaagac gtgcaccagc cag 23

<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 25
tactacctgt ccaaagaaaa gtg 23

<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 26
cccccaacca acaataaagg gcc 23

<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

<210> 28
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 28

gggatctccg tcgctgtcat cgc

23

<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

tgctgggtggt tcatatgtag ngg

23

<210> 30
<211> 22
<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 30

gcaagcactc ttgcaggagc tt

22

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 31

gctctacgac tcaggctaattgt

23

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 32

caacggggtg tgtgaagcag ccgc

24

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 33

gtaagaagtgccttctgcaa acc

23

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 34

205

caaaccttca tgttcaaggg cgg

23

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 35

tgatgctgcc tctggtacta ctgg

24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 36

gcggctgata ccacggattc ctgt

24

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 37

caactgggggt cacgattggg gag

23

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 38

actaattgcg ttngtgtac caaa

24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 39

gagtgtgctt ccaatctgta tctg

24

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 40

gaaacttgca agacaggata tttcc

25

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 41

tttcntaat gataacgctg ata

23

<210> 42

<211> 24

<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 42
ccggtgctat tcttatcacc tgca 24

<210> 43
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 43
gcaaggacga caacactgcg gcc 23

<210> 44
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 44
gtatcgacga gtgcacggga ang 23

<210> 45
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 45
ggcagtgac agctagcata gcag 24

<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 50
ggaaaccttg gtaggattat ttgc 24

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis

<400> 51
aatgctaadc tgtacctgaa ggct 24

<210> 52
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 52
ggcatagatg ggtgctctgc .atg 23

<210> 53
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 53
acaaagggaa 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

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

tgtgcaanng ataacactaa na

22

<210> 56

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 56

ctcgtcggt tcctctgctg gtg

23

<210> 57

<211> 23

<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 57
acccccgcga gaacaaaact gcc 23

<210> 58
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 58
tcctgcccac gcaatctgga cga 23

<210> 59
<211> 25
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 59
attgagccgc gcgctctgtt gcttt 25

<210> 60
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 60
atgcttcctc tgcgcaatta gtgt 24

<210> 61
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 61

caatacaatt taccaccgat cag

23

<210> 62

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 62

tgcacattgt ccattgatag gaa

23

<210> 63

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 63

ctgatcagct gtatcgctc cgg

23

<210> 64

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 64

gtaacagccg cccttgata tga

23

<210> 65

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 65

catctgccgc cngacanntg gtc

23

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 66

cccggcggca cgaagtatcc ttg

23

<210> 67

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 67

accgattggt gagaggcgtc tgc

23

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 68

actttttatc gttcttaact gtta

24

<210> 69

<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 69
tgtgggagcg taacaccgag tgc 23

<210> 70
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 70
cacgcagtac acgtggcggc ctt 23

<210> 71
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 71
cacgcaggag gtggctgagt cct 23

<210> 72
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 72
gtgccggtgc actcttcttc tgt 23

<210> 73
<211> 23
<212> DNA

216

<213> Giardia intestinalis

<400> 73

ttgttttggt ggaccttctt att

23

<210> 74

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 74

gcactcaccg tctccgggca cttt

24

<210> 75

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 75

gctttcttcgt gcacccggtg ccc

23

<210> 76

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 76
ctggtgccct cgtagtnncc tncc 24

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

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

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

<210> 80
<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 80

acctcctcac agacgtcttt tcca

24

<210> 81

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 81

gcttgatatcc gtcggccgga gtc

23

<210> 82

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 82

cactcggagc acccagtggc gca

23

<210> 83

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 83

cacttggtgg cgtcggtccgc attg

24

<210> 84

<211> 25

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<210> 88
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 88

ttccgcaaca caattagcct gag

23

<210> 89
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 89

tgcactttgt attactactg gcg

23

<210> 90
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 90

gcacttctta caagtctgat cag

23

<210> 91
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 91

ttaaattacc agtnnctccc gct

23

<210> 92

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 92

attactctca ccaatcgtga cccc

24

<210> 93

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 93

gcgtnatcat tagggaaata tcc

23

<210> 94

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 94

ttaagggnnc tcaggctatt cgtg

24

<210> 95
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 95
tcaggacaga cccngggtag cag

23

<210> 96
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 96
cgtcggcgca gttttccaaa tac

23

<210> 97
<211> 25
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 97
agtgcaaact ccgttggttt tatcc

25

<210> 98
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 98

gcatcggtg tcgtgcacaa cgt

23

<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

<210> 100

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 100

agtcgtagag caagctcctg caag

24

<210> 101

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 101

accccgttga tgggcacata gttt

24

<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

<210> 103

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 103

gaatcgtaac cccggttgcg tcg

23

<210> 104

<211> 23

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 104

acttagcaca accggccaca ccc

23

<210> 105

<211> 24

<212> DNA

<213> Giardia intestinalis

<400> 105

cttatcagcc gtactacagg taag

24

<210> 106

<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 106
acggtgctag ccctagttgt aga 23

<210> 107
<211> 25
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 107
cgttcttcaa ggnctcaga ttgtt 25

<210> 108
<211> 22
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 108
ctctgcaatg catgttcct tt 22

<210> 109
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 109
cgacccgggt ggtgccgctc ttgc 24

<210> 110
<211> 23
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 110
ccattgctgt ctntatcttg ccc

23

<210> 111
<211> 22
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 111
gtgttatctt ngcacacgat gc

22

<210> 112
<211> 24
<212> DNA
<213> Giardia intestinalis
<400> 112
gacgggagta gaactctgag gaga

24

228

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer sentido S4
<400> 116
cgatcatgac gggcttct 18

<210> 117
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer antisentido R1
<400> 117
ccbacgaggc cyccsacgac 20

<210> 118
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer antisentido R2

<400> 118
cgcttccck ckrcakayga 20

<210> 119
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> primer sentido para vsp1267

<400> 119

atgttggtga tagccttcta tc 22

<210> 120

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer antisentido vsp1267

<400> 120

ctacgccttc cccctgcata tg 22

<210> 121

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer hacia adelante vsp9B10

<400> 121

atgtttggca gttttgttct c 21

<210> 122

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer antisentido vsp9B10

<400> 122

tcacgccttc cctctacata tg 22

<210> 123
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer HL60 gDicer
<400> 123
tggcgggcgctc gtatcagtta t 21

<210> 124
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer HL161 gDicer
<400> 124
tccccgcacg caagaagaa 19

<210> 125
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer HL164 gAgo
<400> 125
attgccccct acggtgtc 18

<210> 126
<211> 18

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer HL165 gAgo
<400> 126
ctctgccggc cttcctac 18

<210> 127
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer HL187 gRdRP
<400> 127
catggggttgc agtttcttga cga 23

<210> 128
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer HL188 gRdRP
<400> 128
agcccccttat ctgttgccctc cttc 24

<210> 129
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer HL 183 CWP1

<400> 129

tcgccctgga tgtttcggac a 21

<210> 130

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer HL184 CWP1

<400> 130

aggcgggtga ggcagta 17

<210> 131

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer HL185 GDH

<400> 131

agtggggcgg gtctttactc a 21

<210> 132

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer HL186 GDH

<400> 132

tgttcgcgcc catctggtag ttct 24

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer RdRP_R 2

<400> 136

tcaccgtcca ggtcactgcc 20

<210> 137

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer of secuencimiento F

<400> 137

cttgtgcata gtaaacaaag 20

<210> 138

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer of secuencimiento R

<400> 138

caaatgggtcg atgctggg 18

<210> 139

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MCSnewSense

<400> 139

gattccgggc ccagatctat cgatacgcgt atgcattcgc gagatatctg c
51

<210> 140

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MCSnewAntisense

<400> 140

gcggccgcag atatctcgcg aatgcatacg cgtatcgata gatctgggcc cg
52

<210> 141

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer DAF

<400> 141

agttgaaact atcatgggttg ctcccgaa 28

<210> 142

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer DAR

<400> 142

ccaccatggt tgaacgccga atccaac 27

23x

CLAIMS

1. Modified protozoan parasite, characterized by comprising simultaneous expression on its surface of more than one variable surface protein.

2. Protozoan of claim 1, characterized by comprising simultaneous expression on its surface of the complete repertoire of variable surface proteins.

3. Protozoan of claim 1, characterized by comprising the reduced expression of enzymes selected from the group comprising Dicer, RNA-dependant RNA-polymerase (RdRP) and both.

4. Protozoan of claim 1, characterized in that RdRP gene has been silenced.

5. Protozoan of claim 1, characterized in that Dicer gene has been silenced.

6. Protozoan of claim 1, characterized in that RdRP genes and Dicer have been silenced.

7. Protozoan of claim 1, characterized by said protozoan comprising an antigenic variation mechanism.

8. Protozoan of claim 1, characterized by said protozoan is selected from the group comprising *Giardia*, *Plasmodium*, *Babesia* and *Trypanosoma*.

9. A vaccine against infections produced by protozoa, characterized by comprising at least modified protozoan expressing on its surface more than one variable surface protein.

10. The vaccine of claim 9, characterized by the protozoan expressing on its surface the complete repertoire of variable surface proteins.

11. The vaccine of claim 9, characterized by the

238

protozoan comprising reduced expression of enzymes selected from the group comprising Dicer, RNA-dependant RNA-polymerase (RdRP) and both.

12. The vaccine of claim 9, characterized in that the protozoan RdRP gene has been silenced.

13. The vaccine of claim 9, characterized in that the protozoan Dicer gene has been silenced.

14. The vaccine of claim 9, characterized in that protozoan RdRP genes and Dicer genes have been silenced.

15. The vaccine of claim 9, characterized in that said protozoan comprises an antigenic variation mechanism.

16. The vaccine of claim 9, characterized in that said protozoan is selected from the group comprising *Giardia*, *Plasmodium*, *Babesia* and *Trypanosoma*.

17. The vaccine of claim 9, characterized by additionally comprising excipients and/or adjuvants.

18. A procedure to purify the complete repertoire of protozoan variable surface proteins (VSP), characterized by comprising:

- a) linking an antibody recognizing the VSP CRKGA amino acid sequence to a solid support;
- b) contacting the solid support with a protozoan; and
- c) separating the complete repertoire of variable surface proteins (VSP).

19. The procedure of claim 18, characterized in that the protozoan is a mixture of clones of wild protozoa, wherein each clone expresses a different variable surface protein.

20. The procedure of claim 18, characterized in that the protozoan is a clone expressing more than one different VSP, wherein said clone is a clone of modified protozoa

comprising silencing of genes selected from the group consisting in RdRP, Dicer and both.

21. The procedure of claim 18, characterized in that the protozoan is a clone expressing the complete repertoire of VSPs, wherein said clone is a clone of modified protozoa comprising silencing of genes selected from the group consisting in RdRP, Dicer and both.

22. The procedure of claim 18, characterized in that the protozoan is selected from the group comprising *Giardia*, *Plasmodium*, *Babesia* and *Trypanosoma*.

23. A vaccine, characterized by comprising more than one protozoan variable surface protein, wherein each of said proteins is different; excipients and/or adjuvants.

24. The vaccine of claim 23, characterized by comprising the complete repertoire of protozoan variable surface proteins, wherein each of said proteins is different.

25. The vaccine of claim 23, characterized in that the protozoan is selected from the group comprising *Giardia*, *Plasmodium*, *Babesia* and *Trypanosoma*.

26. A vaccine, characterized by comprising the complete repertoire of variable surface proteins (VSP), wherein said proteins are obtained employing the procedure of claim 18.

27. An immunization method, characterized by comprising the administration to a mammal of an amount of a vaccine comprising modified protozoan expressing at least two variable surface proteins (VSP).

28. The method of claim 27, characterized in that the protozoan expresses the complete repertoire of VSPs.

29. The method of claim 27, characterized by being

administered in the form selected from the group consisting of oral, subcutaneous, intravenous and intramuscular.

30. The method of claim 27, characterized in that the protozoan is a modified protozoan comprising silencing of genes selected from the group consisting of RdRP, Dicer and both.

31. The method of claim 27, characterized by comprising immunizing a mammal against protozoan infection, wherein said protozoa have an antigenic variation mechanism.

32. An immunization method, characterized by comprising administering to a mammal an amount of a vaccine comprising a combination of protozoan variable surface proteins.

33. The method of claim 32, characterized by being administered in the form selected from the group consisting of oral, subcutaneous, intravenous and intramuscular.

34. The method of claim 32, characterized in that the combination of variable surface proteins are isolated from a modified protozoan comprising silencing of the genes selected from the group consisting of RdRP, Dicer and both.

35. The method of claim 32, characterized by comprising immunizing a mammal against protozoan infection, wherein said protozoa have an antigenic variation mechanism.

36. The method of claim 32, characterized in that at least a dose comprising between 50 and 500 µg of variable surface proteins is administered.

37. A nucleotide sequence characterized by being a sequence selected between sequences SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 112.

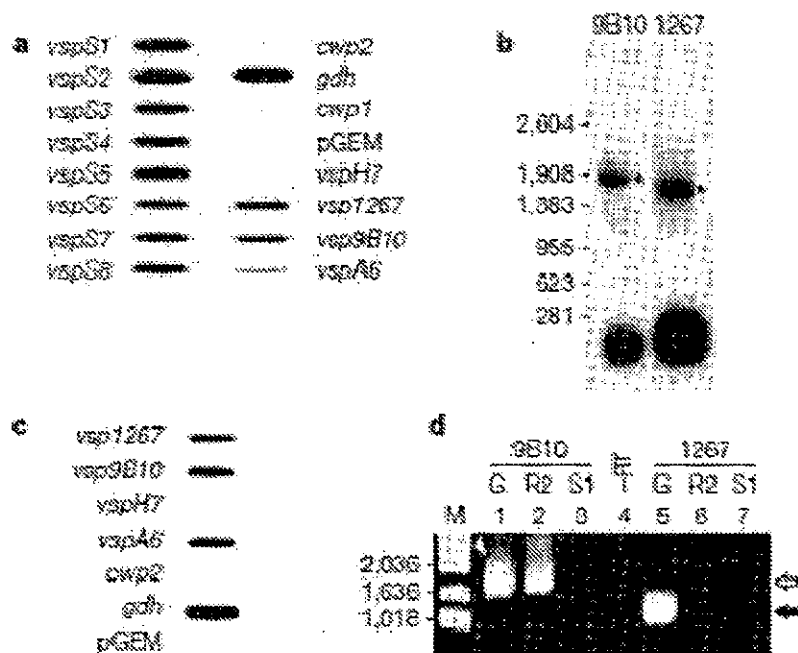


Figure 1

23

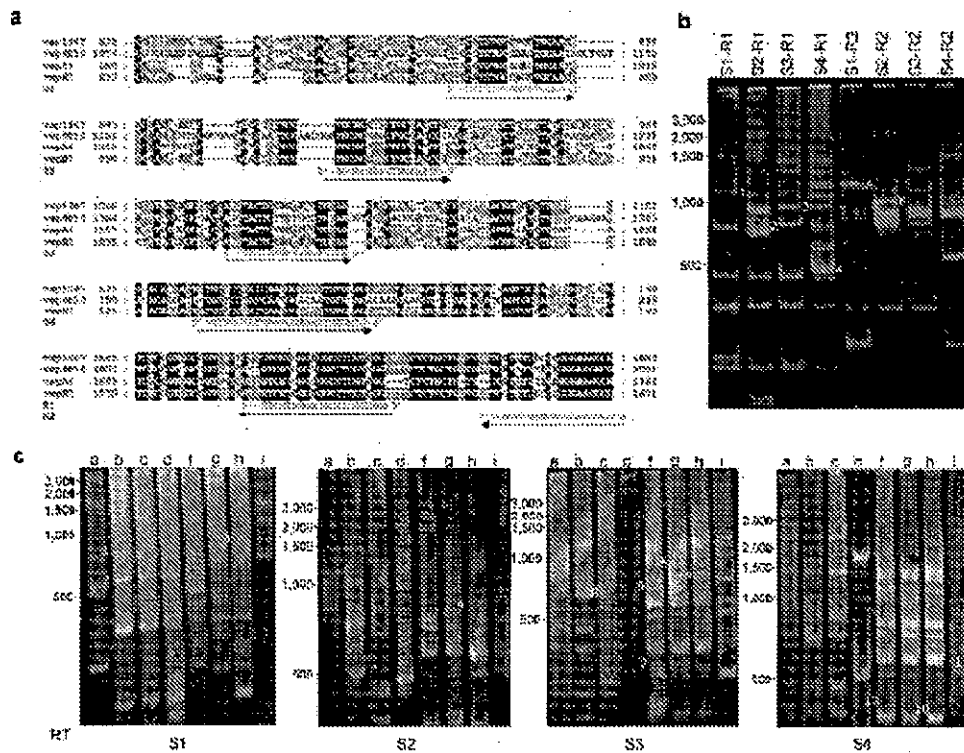


Figure 2

244

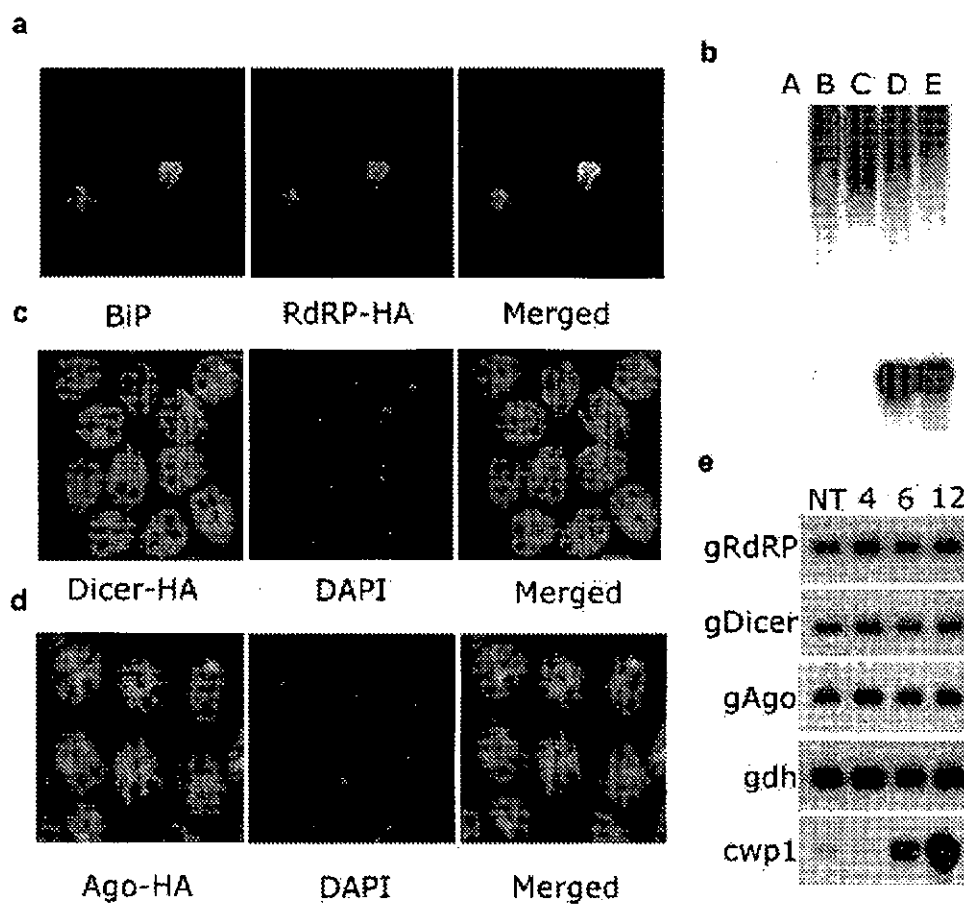


Figure 3

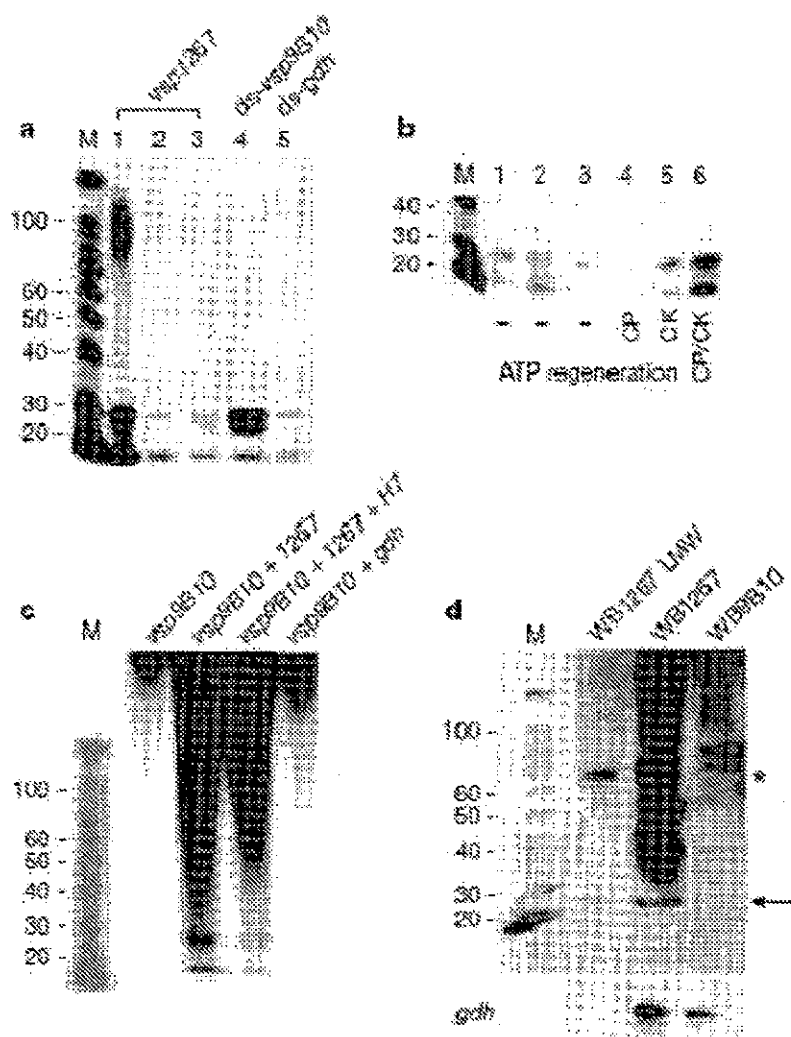


Figure 4

248

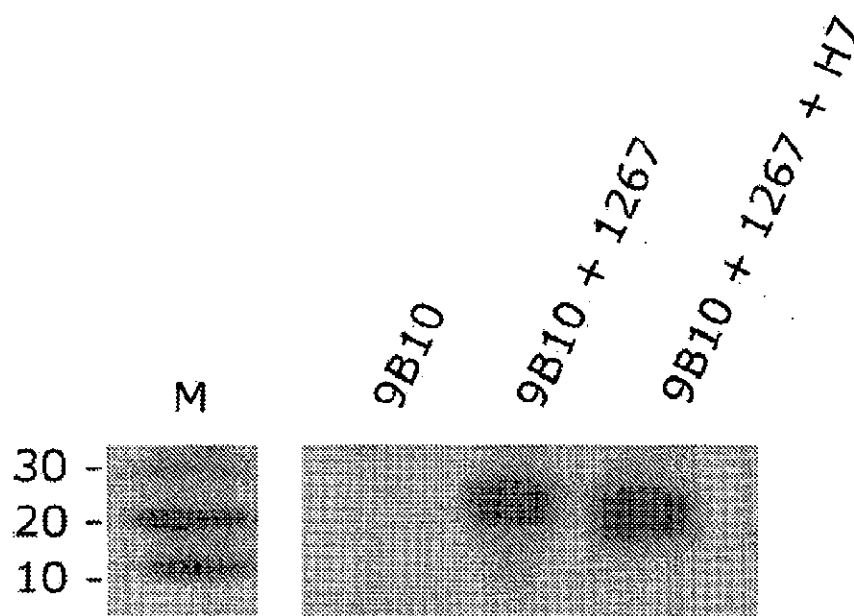


Figure 5

297

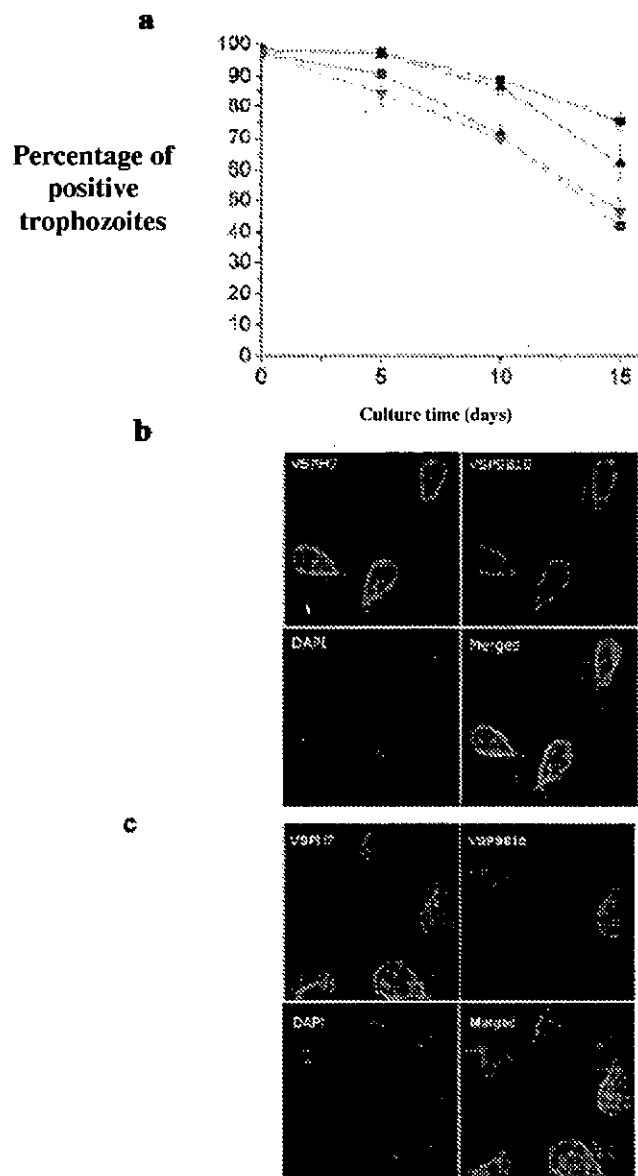
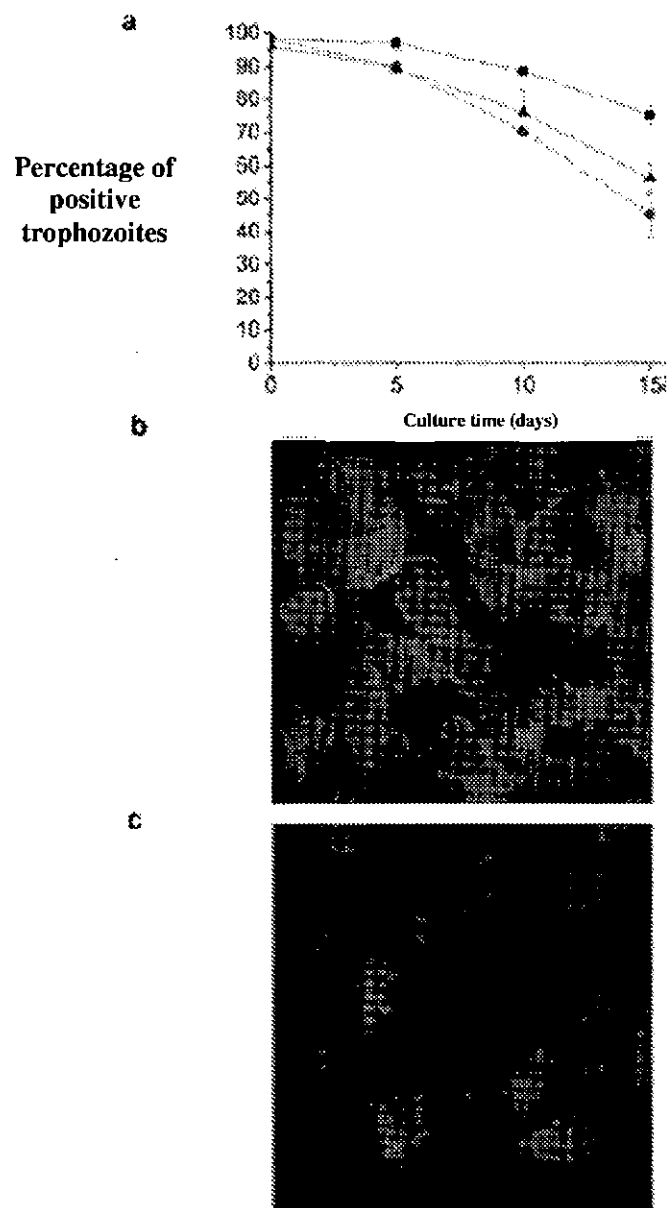


Figure 6

**Figure 7**

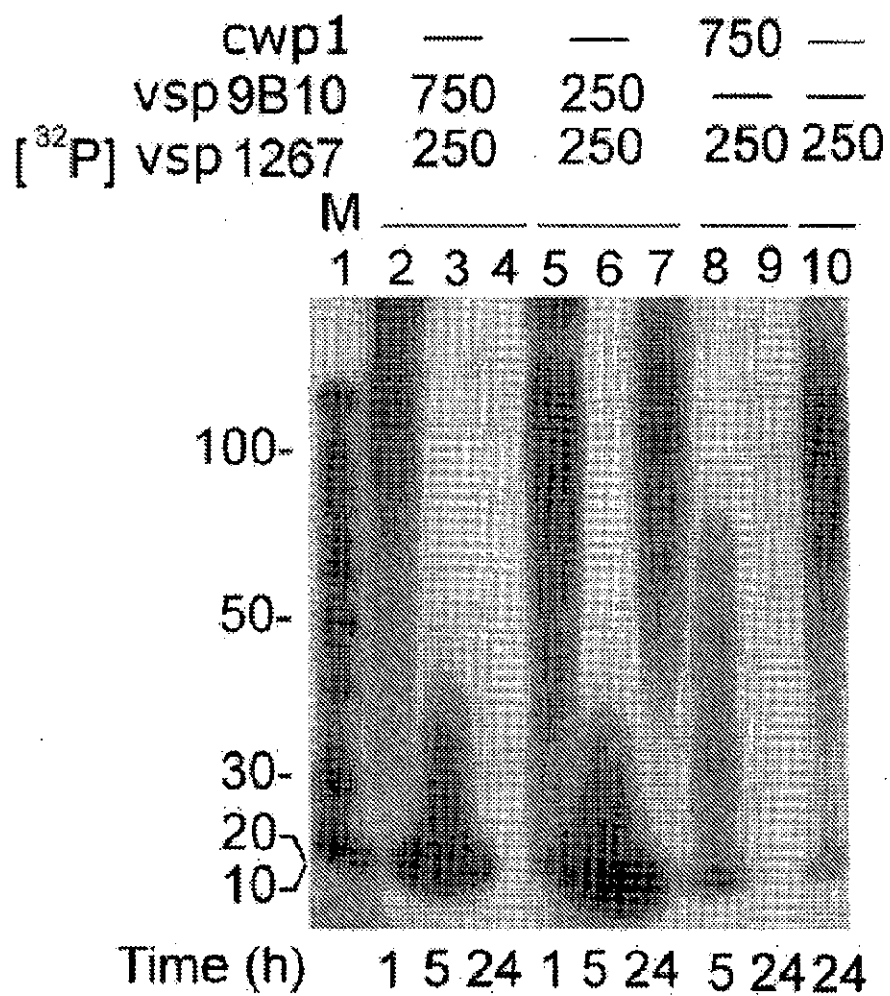


Figure 8

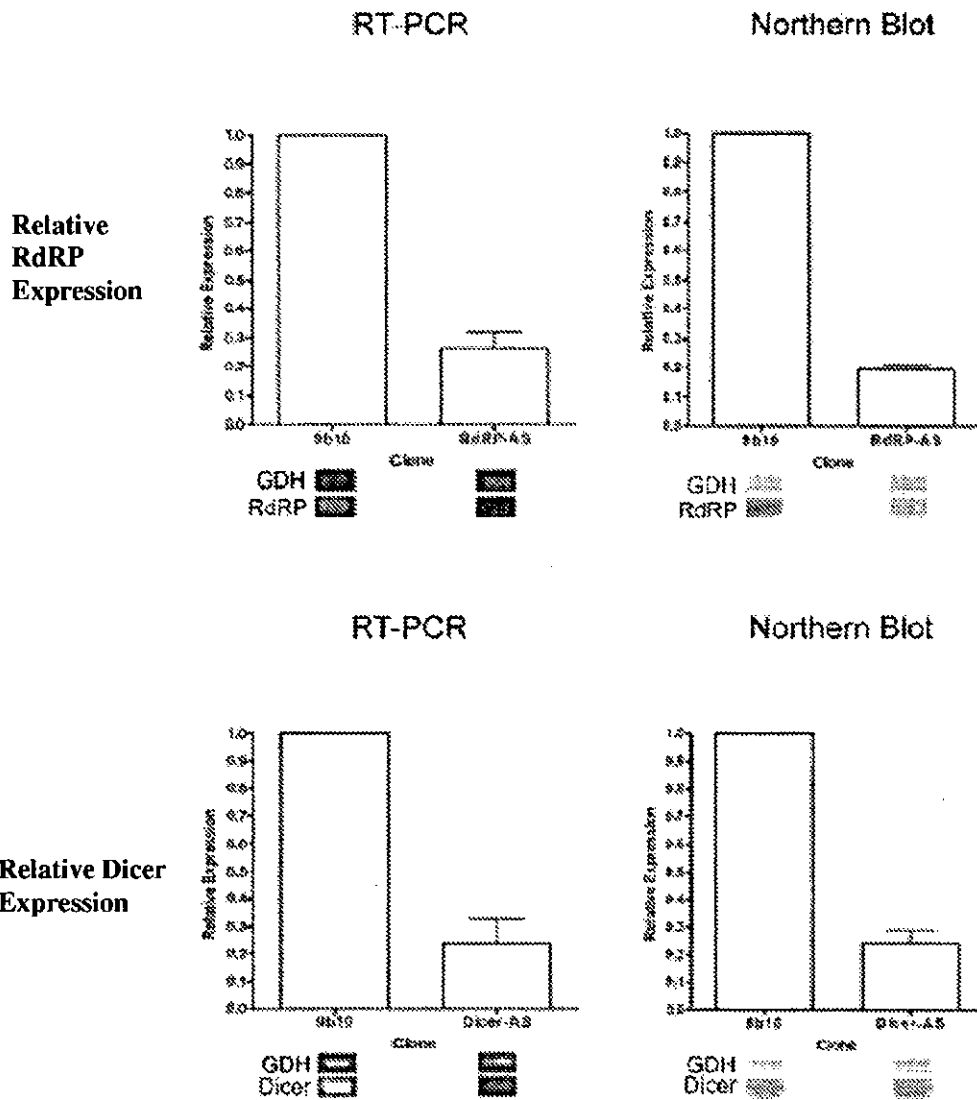


Figure 9

25

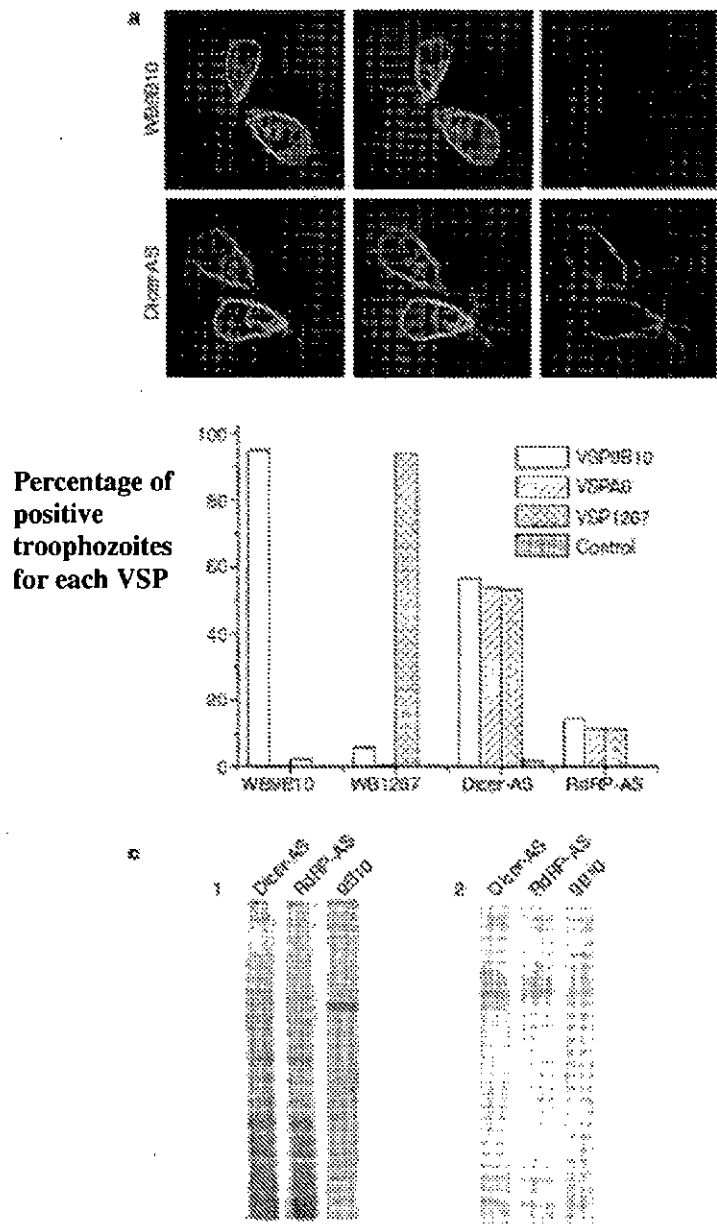


Figure 10

Handwritten signature

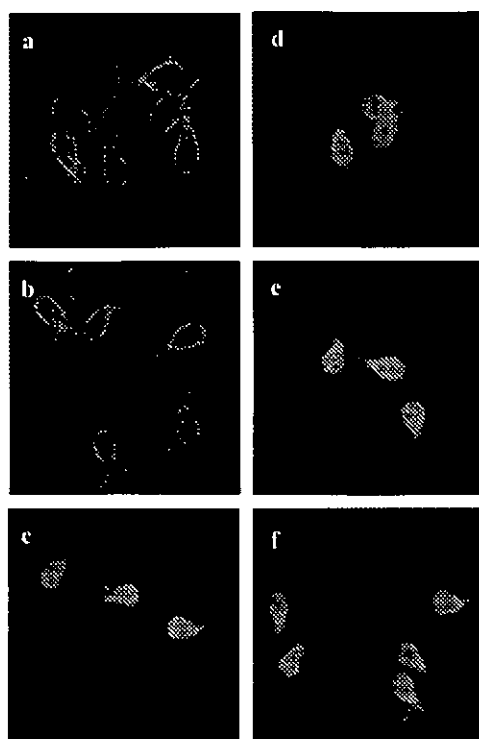


Figure 11

252

	Primary infection	Reinfection with WB9B10	Reinfection with WB1267	Reinfection with cysts
9B10	a	e	i	m
1267	b	f	j	n
DAS	c	g	k	o
RAS	d	h	l	p

Figure 13

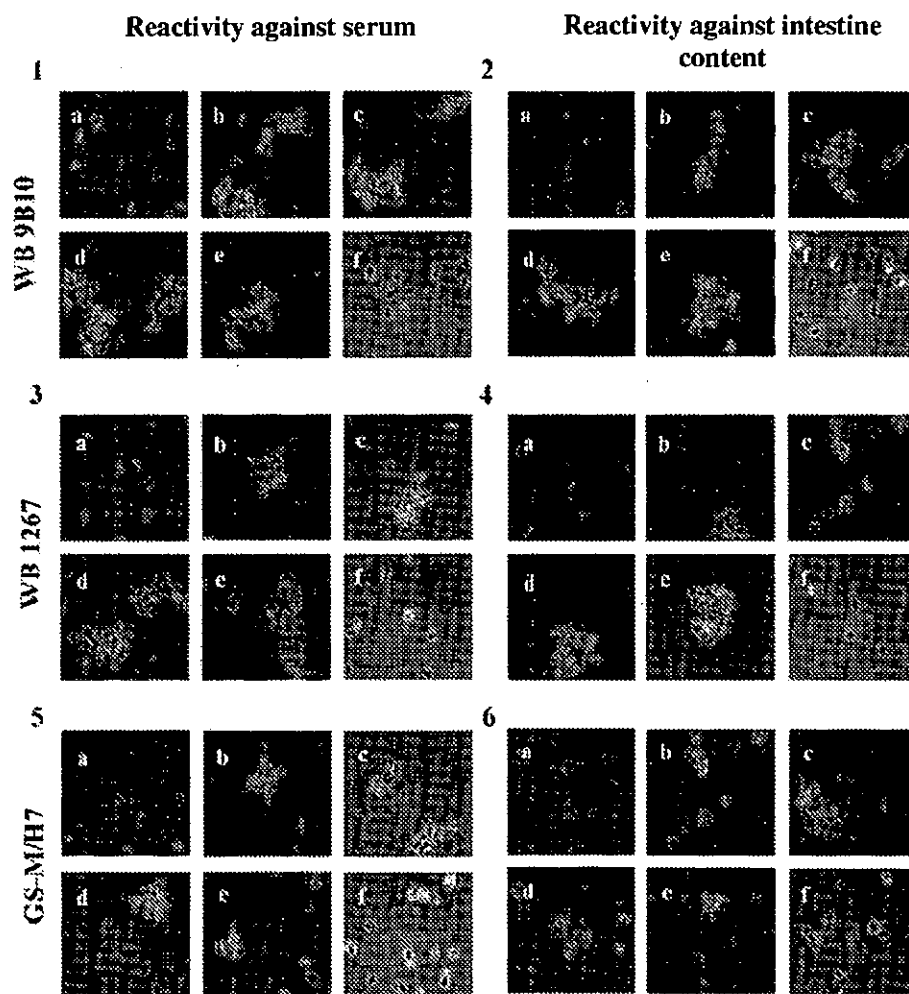
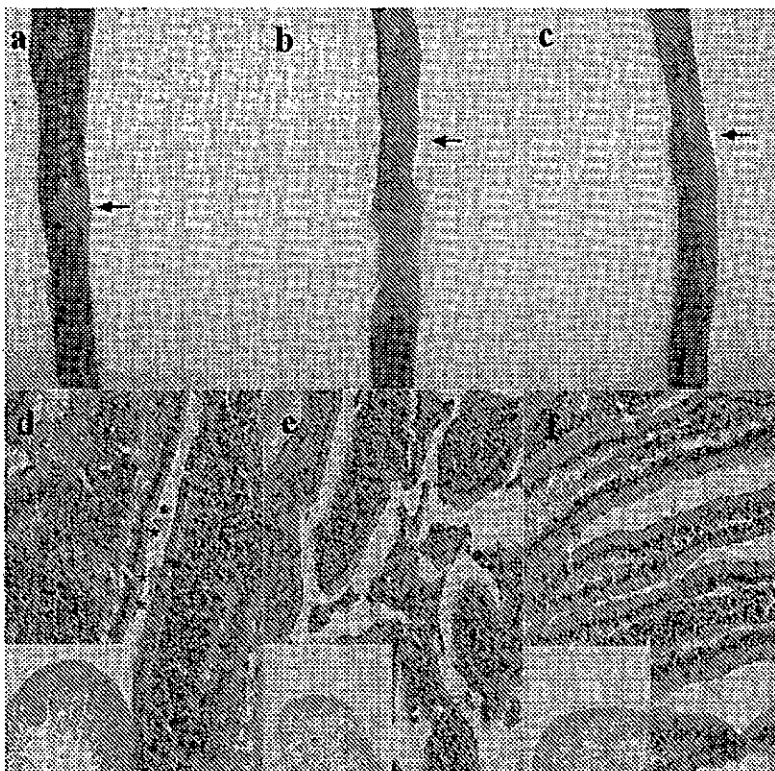


Figure 14

258

**Figure 16**



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-082854-00000-0000

Fecha: 2011-07-01 17:21:04
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Eve: 378 FASENACIONAL
Folios: 257

PATENTE DE INVENCION ☐

MODEL

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CUESTA QUINTERO JUAN CARLOS
Apoderado(a) y/o Representante de
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

REFERENCIA	Radicación No.	11 082854
	Solicitud internacional	PCT/US2009/055470
	Fecha inicio fase nacional	02/07/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

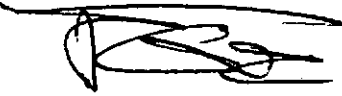
12097
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

05 AGO 2011