REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0618215-1

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0618215-1

(22) Data do Depósito: 02/11/2006

(43) Data da Publicação do Pedido: 18/05/2007

(51) Classificação Internacional: A61K 39/00; A61K 39/385; A61K 39/002; C12P 21/06; C12N 15/00; C12N 1/20; G01N 33/53; C07H 21/04

(30) Prioridade Unionista: US 60/733,119 de 03/11/2005

(54) Título: POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, SEQÜÊNCIA DE POLINUCLEOTÍDEO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE, MÉTODO PARA DETECTAR INFECÇÃO POR T. CRUZI EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA, KIT PARA DETECTAR A REFERIDA INFECÇÃO, E COMPOSIÇÃO

(73) Titular: INBIOS INTERNATIONAL, INC., Sociedade Americana. Endereço: 562 1ST Avenue South, Suite 600, Seattle Wa 98104, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US); INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE, Sociedade Norte-Americana. Endereço: 1124 Columbia Avenue, Suite 400, Seattle WA 98104, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US)

(72) Inventor: RAYMOND L. HOUGHTON; STEVEN G. REED; SYAMAL RAYCHAUDHURI

Código de Controle: 206DB50C959EE9C1 E59D5181FE839684

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 02/10/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 02/10/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, SEQUÊNCIA DE POLINUCLEOTÍDEO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE, MÉTODO PARA DETECTAR INFECÇÃO POR T. CRUZI EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA, KIT PARA DETECTAR A REFERIDA INFECÇÃO, E COMPOSIÇÃO".**

DECLARAÇÃO RELACIONADA À PESQUISA OU DESENVOLVIMENTO PATROCINADO PELO GOVERNO

O Governo dos EUA tem uma licença saldada nessa invenção e o direito em circunstâncias limitadas de requerer que o proprietário da patente licencie outros em termos justos conforme fornecidos pelos termos da Concessão N°. 2 R 44AIO52683-02 outorgada pelo *National Institutes of Health*.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se geralmente ao diagnóstico de infecção por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Mais especificamente, a invenção refere-se ao uso de polipeptídeos antigênicos e polipeptídeos de fusão de *T. cruzi* em métodos para rastrear indivíduos e suprimentos de sangue para infecção por *T. cruzi*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Parasitas protozoários são uma grave ameaça à saúde em várias áreas do mundo. *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é um de tal parasita que infecta milhões de indivíduos. Dez a trinta por cento de indivíduos infectados com *T. cruzi* desenvolvem doença de Chagas sintomática crônica, que pode por sua vez levam à doença cardíaca e uma variedade de desordens do sistema imune. A infecção por *T. cruzi* há muito é um problema de saúde pública na América Central e do Sul. Estima-se que 18 milhões de pessoas em todo o mundo estejam cronicamente infectadas com *T. cruzi*, mas tratamentos com fármacos disponíveis não têm eficácia e freqüentemente causam sérios efeitos colaterais.

A via de transmissão mais significativa em áreas onde a doença é endêmica é através do contato com um inseto triatomíneo infectado. Entretanto, em outras áreas, transfusões de sangue são os meios dominantes de transmissão. Conseqüentemente, a fim de inibir a transmissão de *T. cruzi*, é necessário desenvolver métodos precisos para diagnosticar e infecção por

T. cruzi em indivíduos e para rastrear suprimentos de sangue. Rastreamento de bancos de sangue é particularmente importante na América do Sul, onde 0,1% - 62% de amostras de sangue podem estar infectadas e onde o parasita é freqüentemente transmitido por transfusão de sangue. Devido ao alto fluxo de imigrantes para os EUA de vários países na América Central e do Sul onde a infecção por *T. cruzi* é endêmica, o suprimento de sangue dos EUA está se tornando em alto risco para contaminação por doadores de sangue infectados por *T. cruzi*. Embora haja poucos testes disponíveis para diagnosticar a infecção em indivíduos, não há atualmente nenhum teste aprovado pelo FDA disponível nos EUA para rastreamento de doadores de sangue para infecção por *T. cruzi*.

O diagnóstico de infecção por *T. cruzi* tem sido problemático, já que métodos precisos para detectar o parasita, que sejam adequados para uso de rotina, não estão disponíveis. Durante a fase aguda da infecção, que pode durar décadas, a infecção pode permanecer quiescente e o hospedeiro pode ser assintomático. Como um resultado, testes sorológicos para infecção por *T. cruzi* são os mais confiáveis e a forma mais comumente usada de diagnóstico. Tais diagnósticos são complicados, entretanto, pelo ciclo de vida complexo do parasita e as diversas respostas imunes do hospedeiro. O parasita passa através de um estágio de epimastigoto no inseto vetor e dois estágios principais no hospedeiro mamífero. Um estágio do hospedeiro está presente no sangue (o estágio tripomastigoto), enquanto que um segundo estágio é intracelular (o estágio amastigoto). Os múltiplos estágios resultam em uma diversidade de antígenos sendo apresentados pelo parasita durante a infecção. Além disso, respostas imunes à infecção por protozoário são complexas, envolvendo tanto a resposta humoral como mediada por células ao grupo de antígenos do parasita.

Embora a detecção de anticorpos contra os antígenos do parasita seja o método mais comum e confiável de diagnosticar infecções clínicas e subclínicas, testes atuais para infecção por *T. cruzi* são geralmente insensíveis, inespecíficos, e não são adequados para rastreamento de suprimentos de sangue. A maioria dos testes sorológicos usa *T. cruzi* inteiro ou lisado

e requer resultados positivos em dois de três testes, incluindo fixação de complemento, imunofluorescência indireta, aglutinação passiva ou ELISA, para detectar de forma precisa a infecção por *T. cruzi*. O custo e a disponibilidade de tais testes impediram o rastreamento de sangue ou soro em muitas áreas endêmicas.

As Patentes US 5.876.734 e 6.228.601 descrevem composições úteis para diagnosticar doença de Chagas que compreendem uma região não repetitiva da proteína de *T. cruzi* TCR27, e polipeptídeos de fusão que incluem tais regiões. A Patente US 6.419.933 descreve um polipeptídeo de fusão referido como TcF que contém os quatro peptídeos antigênicos de *T. cruzi* PEP-2, TcD, TcE e TcLo1.2, junto com métodos para uso do polipeptídeo de fusão na detecção de infecção por *T. cruzi*. Enquanto que TcF é altamente reativo com soros infectados por *T. cruzi* da América do Sul, ele exibe baixa atividade, e é ocasionalmente negativo com soros da América Central. A Patente US 6.458.922 descreve um ensaio para infecção por *T. cruzi* que emprega composições que compreendem pelo menos seis peptídeos antigênicos de *T. cruzi* selecionados a partir do grupo que consiste em: SAPA, CRA, FRA, TcD, Tc24, Ag39 e MAP. O Pedido de Patente US Publicado N°. US-2004/0132077-A1 descreve polipeptídeos e polipeptídeos de fusão recombinantes (referidos como FP3, FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9 e FP10) úteis para diagnosticar infecção por *T. cruzi*. Os polipeptídeos de fusão descritos compreendem versões modificadas de epítopos de *T. cruzi* anteriormente identificados, incluindo TCR27, TCR39, SAPA e MAP.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece composições e métodos para detectar infecção por *T. cruzi* em indivíduos e em amostras biológicas, incluindo suprimentos de sangue, as composições da invenção podem ser empregadas para detectar infecção por *T. cruzi* em todas as áreas geográficas onde a doença de Chagas está presente e com sensibilidade melhorada em comparação a ensaios atualmente em uso.

Em uma modalidade, as composições da invenção compreendem polipeptídeo de fusão de *T. cruzi* TcT (SEQ ID NO: 1), ou uma variante

desse, e pelo menos um peptídeo selecionado a partir do grupo que consiste em SAPA (SEQ ID NO: 2); Pep30 (SEQ ID NO: 3); Pep36 (SEQ ID NO: 4); KMP-11 (SEQ ID NO: 5); Peptídeo 1 (SEQ ID NO: 6; também referido como FRA; Lafaille *et al., Mol. Biochem. Parasitol.* 35:127-136, 1989); uma versão modificada do Peptídeo 1 (SEQ ID NO: 7); e variantes desses. O polipeptídeo de fusão TcF e o pelo menos um peptídeo podem estar presentes como componentes individuais dentro da composição ou podem estar ligados para formar um polipeptídeo de fusão. Em certas modalidades, as composições da invenção compreendem o polipeptídeo de fusão TcF em combinação com os peptídeos Pep30, Pep36 e SAPA. Tais composições podem, por exemplo, incluir o polipeptídeo de fusão de SEQ ID NO: 8 (referido aqui como ITC-6). Em modalidades alternativas, as composições da invenção incluem um polipeptídeo de fusão que compreende ITC-6 em combinação com pelo menos uma repetição do peptídeo KMP-11, e/ou as seqüências de peptídeo 1 de SEQ ID NO: 6 ou 7. A seqüência de aminoácido de um polipeptídeo de fusão representativo que compreende ITC-6 mais uma repetição de KMP-11 (referido como ITC7.1) é fornecida em SEQ ID NO: 15, com a seqüência de aminoácido de um polipeptídeo de fusão representativo que compreende ITC-6 mais duas repetições de KMP-11 (referido como ITC7.2) sendo fornecida em SEQ ID NO: 17. SEQ ID NO: 19 é a seqüência de aminoácido de um polipeptídeo de fusão representativo que compreende ITC7.2 mais peptídeo 1 (referido como ITC8.2), com a seqüência de DNA correspondente sendo fornecida em SEQ ID NO: 18. A seqüência de aminoácido de uma versão encurtada de ITC8.2, referida como ITC8.1, é fornecida em SEQ ID NO: 20. SEQ ID NO: 21 e 22 são as seqüências de DNA e aminoácido, respectivamente, para uma versão encurtada de ITC8.1.

Polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos de fusão da invenção, vetores de expressão que compreendem tais polinucleotídeos, e células hospedeiras transformadas ou transfectadas com tais vetores de expressão também são fornecidos pela presente invenção.

Como descrito em detalhe abaixo, os inventores determinaram que as composições da invenção podem ser empregadas para detectar efi-

cazmente infecção por *T. cruzi* em uma amostra biológica. Conseqüentemente, em um aspecto, a presente invenção fornece métodos para detectar infecção por *T. cruzi* em uma amostra biológica, que compreende: (a) colocar a amostra biológica em contato com uma composição da presente invenção; e (b) detectar na amostra biológica a presença de anticorpos que se ligam a um epítopo presente dentro da composição da invenção, detectando dessa maneira a infecção por *T. cruzi* na amostra biológica.

Em um aspecto adicional, são fornecidos kits de diagnóstico para detectar infecção por *T. cruzi* em uma amostra biológica, tais kits compreendendo: (a) uma composição da presente invenção; e (b) um reagente de detecção.

As composições da invenção também podem compreender pelo menos um componente selecionado a partir do grupo que consiste em: veículos e imunoestimulantes fisiologicamente aceitáveis. Métodos para induzir imunidade protetora contra doença de Chagas em um paciente por administrar tais composições também são abrangidos pela presente invenção.

As características mencionadas acima e adicionais da presente invenção e a maneira de obtê-las se tornarão claras, e a invenção será mais bem compreendida por referência a seguinte descrição detalhada. Todas as referências descritas aqui estão por meio desse incorporadas na sua totalidade como se cada estivesse incorporada individualmente.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 mostra a reatividade dos polipeptídeos de fusão TcF e ITC-6 com soros infectados por *T. cruzi* e soros de controle de indivíduos não infectados, conforme determinado por ELISA.

Figuras 2A-C mostram a reatividade de TcF e ITC-6 com vários soros conforme determinado por ELISA. Os estados de RIPA dos soros individuais são mostrados na Tabela 1.

Figura 3 mostra a reatividade dos polipeptídeo de fusão TcF, ITC-6, ITC7.1 e ITC7.2 em um painel de soros conforme determinado por ELISA.

Figura 4 mostra a reatividade dos polipeptídeos de fusão ITC7.2 e da versão encurtada de ITC8.2 fornecidos em SEQ ID NO: 22 em um pai-

nel de soros conforme determinado por ELISA.

Figura 5 mostra a atividade de soros positivos para peptídeo 1 não-absorvido e absorvido com ITC7.2, ITC8.1 e ITC8.2 encurtado (SEQ ID NO: 22).

Figuras 6A e 6B mostram a seqüência de DNA isolada e seqüência de aminoácido correspondente, respectivamente, para TC5. O inserto é mostrado em fonte em negrito, e a seqüência flanqueadora em fonte regular (não negrito).

Figuras 7A e 7B mostram a seqüência de DNA isolada e seqüência de aminoácido correspondente, respectivamente, para TC48. O inserto é mostrado em fonte em negrito, e a seqüência flanqueadora em fonte regular (não negrito).

Figuras 8A e 8B mostram a seqüência de DNA isolada e a seqüência de aminoácido correspondente, respectivamente, para TC60. O inserto é mostrado em fonte em negrito, e a seqüência flanqueadora em fonte regular (não negrito).

Figuras 9A e 9B mostram a seqüência de DNA isolada e a seqüência de aminoácido correspondente, respectivamente, para TC70. O inserto é mostrado em fonte em negrito, e a seqüência flanqueadora em fonte regular (não negrito).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Como observado acima, a presente invenção é geralmente direcionada a composições e métodos para detectar infecção por *T. cruzi* em indivíduos e para rastrear suprimentos de sangue por infecção por *T. cruzi*. As composições dessa invenção compreendem geralmente o polipeptídeo de fusão de *T. cruzi* conhecido TcF (Patente US N°. 6.419.933; SEQ ID NO: 1), ou uma variante desse, e pelo menos um epítopo ou polipeptídeo antigênico de *T. cruzi* selecionado a partir do grupo que consiste em: SAPA (SEQ ID NO: 2); Pep30 (SEQ ID NO: 3); Pep36 (SEQ ID NO: 4); KMP-11 (SEQ ID NO: 5); peptídeo 1 (SEQ ID NO: 6); peptídeo 1 modificado (SEQ ID NO: 7); e variantes desses. O uso de um ou mais epítopos adicionais de polipeptídeos de *T. cruzi*, antes de ou em combinação com um ou mais dos polipeptídeos de

T. cruzi específicos descritos aqui, a fim de aumentar a sensibilidade e especificidade de detecção também é contemplado dentro da presente invenção. O polipeptídeo de fusão TcF e o pelo menos um peptídeo podem estar presentes como componentes individuais dentro da composição da invenção e/ou podem estar ligados para formar um polipeptídeo de fusão. Polipeptídeos de fusão que compreendem mais de uma repetição dos epítopos ou polipeptídeos antigênicos de *T. cruzi* também são contemplados e abrangidos pela presente invenção, da mesma forma que polipeptídeos de fusão nos quais os peptídeos estão ligados em uma ordem que difere daquela mostrada nas seqüências de polipeptídeo de fusão específicas fornecidas aqui.

Em uma modalidade, as composições da invenção incluem um polipeptídeo de fusão que compreende TcF, Pep30, Pep36 e SAPA, aqui referido como ITC-6 (SEQ ID NO: 8). Em modalidades alternativas, as composições da invenção incluem uma proteína de fusão selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 15 (referida como ITC7.1), SEQ ID NO: 17 (referida como ITC7.2), SEQ ID NO: 19 (referida como ITC8.2), e SEQ ID NO: 20 (referida como ITC8.1). As seqüências de DNA para ITC-6, ITC7.1, ITC7.2 e ITC8.2 são fornecidas em SEQ ID NO: 11, 14, 16 e 18, respectivamente.

Como descrito na Patente US 6.419.933, a descrição da qual está por meio desse incorporada por referência, o polipeptídeo de fusão TcF inclui quatro epítopos ou peptídeos antigênicos, referidos como PEP2, TcD, TcE e TcLo1.2. Em uma modalidade alternativa, as composições da invenção podem incluir esses quatro peptídeos individuais no lugar da proteína de fusão TcF.

Como usado aqui, o termo "polipeptídeo" abrange cadeias de aminoácido de qualquer extensão, incluindo proteínas de extensão completa, em que resíduos de aminoácido são ligados por ligações peptídicas covalentes. Polipeptídeos descritos aqui podem ser produtos purificados naturalmente, ou podem ser produzidos parcialmente ou integralmente usando técnicas recombinantes. Tais polipeptídeos podem ser glicosilados com carboidratos de mamífero ou outros carboidratos eucarióticos ou podem ser não glicosilados. Um polipeptídeo que compreende um epítopo pode consistir inteiramente no epítopo ou pode conter seqüências adicionais. As seqüên-

cias adicionais podem ser derivadas do antígeno nativo ou podem ser heterólogas e tais seqüências podem (mas não precisam) ser antigênicas.

Como usado aqui, um "polipeptídeo de fusão" é um polipeptídeo no qual epítopos de antígenos diferentes, ou variantes desses, estão unidos, por exemplo, através de uma ligação de peptídeo, em uma única cadeia de aminoácido. A cadeia de aminoácido assim formada pode ser linear, ou ramificada. Os epítopos podem ser unidos diretamente (isto é, sem aminoácidos interferentes) ou podem ser unidos por meio de uma seqüência ligante que não altera significativamente as propriedades antigênicas dos epítopos. Os epítopos de peptídeo também podem ser ligados através de ligações não peptídicas, tais como agentes hetero- ou homo-bifuncionais que se acoplam quimicamente ou fotoquimicamente entre grupos funcionais específicos em epítopos de peptídeos tais como através de grupos amino, carboxila, ou sulfidrila. Agentes bifuncionais que podem ser empregados de forma útil nos polipeptídeos de combinação da presente invenção são bem conhecidos dos versados na técnica. Epítopos também podem ser ligados por meio de um par ligante/antiligante complementar, tal como avidina/biotina, com um ou mais epítopos estando ligados a um primeiro membro do par ligante/antiligante e sendo ligados ao membro complementar do par de ligante/antiligante em solução ou em fase sólida. Um polipeptídeo de fusão pode conter epítopos de um ou mais antígenos de *T. cruzi,* ligados a um epítopo descrito aqui.

Um polinucleotídeo que codifica uma proteína de fusão da presente invenção é construído usando técnicas de DNA recombinantes conhecidas para unir polinucleotídeos separados que codificam os primeiro e segundo polipeptídeos em um vetor de expressão apropriado. A extremidade 3' de um polinucleotídeo que codifica um primeiro polipeptídeo é ligada, com ou sem um ligante de peptídeo, à extremidade 5' de um polinucleotídeo que codifica um segundo polipeptídeo para que as fases abertas de leitura das seqüências estejam *in phase* para permitir a tradução do RNAm dos dois polinucleotídeos em uma única proteína de fusão que retém a atividade biológica tanto do primeiro como do segundo polipeptídeo.

Como observado acima, uma seqüência ligante de peptídeo po-

de ser empregada para separar os primeiro e segundo polipeptídeos por uma distância suficiente para garantir que cada polipeptídeo se dobre em suas estruturas secundárias e terciárias. Tal ligante de peptídeo é incorporada na proteína de fusão usando procedimentos padrão bem conhecidos na técnica. Seqüências ligantes de peptídeo adequadas podem ser escolhidas com base nos seguintes fatores: (1) sua habilidade para adotar uma conformação estendida flexível; (2) sua inabilidade para adotar uma estrutura secundária que possa interagir com epítopos funcionais nos primeiro e segundo polipeptídeos; e (3) a falta de resíduos hidrofóbicos ou carregados que possam reagir com os epítopos do polipeptídeo funcional. Seqüências ligantes de peptídeo preferidas contêm resíduos Gly, Asn e Ser. Outros aminoácidos quase neutros, tais como Thr e Ala também podem ser usados na seqüência ligante. Seqüências de aminoácido que podem ser empregadas de forma útil como ligantes incluem aquelas descritas em Maratea *et al.*, *Gene 40*:39-46, 1985; Murphy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83*:8258-8262, 1986; Patente U.S. N°. 4.935.233 e Patente U.S. N°. 4.751.180. A seqüência ligante pode ter de 1 a cerca de 50 aminoácidos de extensão. Seqüências ligantes de peptídeo não são necessárias quando os primeiro e segundo polipeptídeos têm regiões de aminoácido N-terminais não essenciais que podem ser usadas para separar os domínios funcionais e impedir interferência estérica. Os polinucleotídeos ligados que codificam as proteínas de fusão são clonados em sistemas de expressão adequados usando procedimentos conhecidos daqueles versados na técnica.

A presente invenção ainda fornece polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão da presente invenção. Polinucleotídeos que compreendem complementos de tais seqüências de polinucleotídeos, complementos reversos de tais seqüências de polinucleotídeo, ou seqüências reversas de tais seqüências de polinucleotídeo, junto com variantes de tais seqüências, também são fornecidas.

A definição dos termos "complemento(s)", "complemento(s) reverso(s)" e "seqüência(s) reversa(s)", como usados aqui, é mais bem ilustrada pelo seguinte exemplo. Para a seqüência 5' AGGACC 3', o complemento,

complemento reverso e seqüência reversa as como segue:

complemento	3' TCCTGG 5'
complemento	reverso 3' GGTCCT 5'
seqüência reversa	5' CCAGGA 3'.

Preferivelmente, seqüências que são complementos de uma seqüência de polinucleotídeo especificamente citada são complementares por toda a extensão da seqüência de polinucleotídeo específica.

O termo "polinucleotídeo(s)" como usado aqui, significa um polímero de fita simples ou dupla de bases de desoxirribonucleotídeo ou ribonucleotídeo e inclui moléculas de DNA e RNA correspondentes, incluindo moléculas de HnRNA e RNAm, ambas as fitas sentido e anti-sentido, e abrange cDNA, DNA genômico e DNA recombinante, assim como polinucleotídeos integralmente ou parcialmente sintetizados. Uma molécula de HnRNA contém íntrons e corresponde a uma molécula de DNA geralmente de uma forma de um para um. Uma molécula de RNAm corresponde a uma molécula de HnRNA e DNA das quais os íntrons foram retirados. Um polinucleotídeo pode consistir em um gene inteiro, ou qualquer porção desse. Polinucleotídeos antisenso operáveis podem compreender um fragmento do polinucleotídeo correspondente, e a definição de "polinucleotídeo", portanto inclui todos os tais fragmentos antisenso operáveis.

Todos os polipeptídeos, polipeptídeos de fusão e polinucleotídeos descritos aqui são isolados e purificados, conforme esses termos são comumente usados na técnica. Preferivelmente, os polipeptídeos, polipeptídeos de fusão e polinucleotídeos são pelo menos 80% puros, mais preferivelmente pelo menos 90% puros, e o mais preferivelmente pelo menos 99% puros.

As composições e métodos da presente invenção também abrangem variantes dos polipeptídeos, polipeptídeos de fusão e polinucleotídeos acima.

Como usado aqui, o termo "variante" abrange seqüências de nucleotídeo ou aminoácido diferentes das seqüências especificamente identificadas, em que um ou mais nucleotídeos ou resíduos de aminoácido é(são) deletado(s), substituído(s) ou adicionado(s). Variantes podem ser variantes

alélicas de ocorrência natural ou variantes de ocorrência não natural. Seqüências variantes (polinucleotídeo ou polipeptídeo) exibem preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente ainda pelo menos 95%, e o mais preferivelmente pelo menos 98% de identidade a uma seqüência da presente invenção. O percentual de identidade é determinado por alinhar as duas seqüências a ser comparadas como descrito abaixo, determinar o número de resíduos idênticos na porção alinhada, dividir este número pelo número total de resíduos da seqüência da invenção (pesquisada), e multiplicar o resultado por 100. Além de exibir o nível citado de identidade de seqüência, seqüências variantes da presente invenção exibem preferivelmente uma funcionalidade que é substancialmente similar a funcionalidade das seqüências específicas descritas aqui. Seqüências de polipeptídeo de fusão variantes assim retêm preferivelmente as propriedades antigênicas e de diagnóstico dos polipeptídeos de fusão descritos aqui. Preferivelmente uma seqüência de peptídeo ou de polipeptídeo de fusão variante irá gerar pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente ainda pelo menos 95% e o mais preferivelmente 100% da resposta gerada pela seqüência do polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão especificamente identificado em um ensaio de ligação de anticorpo, tal como um ensaio ELISA. Tais variantes podem ser geralmente identificadas por modificar uma das seqüências de polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão descritas aqui, e avaliar as propriedades antigênicas e/ou de diagnóstico do polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão modificado usando, por exemplo, os procedimentos representativos descritos aqui. Ensaios adequados para avaliar a reatividade com soros infectados por T. cruzi, tal como um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), são descritos em mais detalhes abaixo, e em Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Seqüências variantes geralmente diferem da seqüência especificamente identificada apenas por substituições, deleções ou modificações conservativas. Como usado aqui, "uma substituição conservativa" é uma na

qual um aminoácido é substituído por outro aminoácido que tem propriedades similares, tal que um versado na técnica de química de peptídeo possa esperar que a estrutura secundária e a natureza hidropática do polipeptídeo estejam substancialmente inalteradas. Em geral, os seguintes grupos de aminoácidos representam alterações conservativas: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; and (5) phe, tyr, trp, his. Variantes podem também, ou alternativamente, conter outras modificações, incluindo a deleção ou adição de aminoácidos que têm influência mínima nas propriedades antigênicas, estrutura secundária e natureza hidropática do polipeptídeo. Por exemplo, um polipeptídeo pode ser conjugado a uma seqüência de sinal (ou líder) na extremidade de N-terminal da proteína que direciona co-traducionalmente ou pós-traducionalmente a transferência da proteína. O polipeptídeo também pode ser conjugado a um ligante ou outra seqüência para facilidade de síntese, purificação ou identificação do polipeptídeo (por exemplo, poli-His), ou para aumentar a ligação do polipeptídeo a um suporte sólido. Por exemplo, um polipeptídeo pode ser conjugado a uma região Fc de imunoglobulina.

Seqüências de polipeptídeo ou polinucleotídeo podem ser alinhadas e porcentagens de nucleotídeos idênticos em uma região especificada podem ser determinadas contra outro polinucleotídeo, usando algoritmos de computador que estão disponíveis para o público. Dois algoritmos exemplares para alinhar e identificar a identidade de seqüências de polinucleotídeo são os algoritmos BLASTN e FASTA. O alinhamento e identidade de seqüências de polipeptídeo podem ser examinados usando o algoritmo BLASTP. Os algoritmos BLASTX e FASTX comparam seqüências de nucleotídeo pesquisadas traduzidas em todas as fases de leitura contra seqüências de polipeptídeo. Os algoritmos FASTA e FASTX são descritos em Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448, 1988; e em Pearson, *Methods in Enzymol.* 183:63-98, 1990. O pacote de programas FASTA está disponível pela University of Virginia, Charlottesville, VA 22906-9025. O algoritmo FASTA, ajustado para os parâmetros predeterminados descritos na documentação e distribuídos com o algoritmo, podem ser usados na determinação de variantes de po-

linucleotídeos. Os arquivos "leia-me" para FASTA e FASTX Versão 2.0x que são distribuídos com os algoritmos descrevem o uso dos algoritmos e descrevem os parâmetros predeterminados.

O programa BLASTN está disponível no servidor FTP anônimo do NCBI e está disponível pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, Edifício 38A, Sala 8N805, Bethesda, MD 20894. O algoritmo BLASTN Versão 2.0.6 [10-Set-1998] e Versão 2.0.11 [20-Jan-2000] ajustado para os parâmetros predeterminados descritos na documentação e distribuídos com o algoritmo, é preferido para uso na determinação de variantes de acordo com a presente invenção. O uso da família de algoritmos BLAST, incluindo BLASTN, é descrito no página da internet do NCBI e na publicação de Altschul, *et al.*, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997.

Os "acertos (hits)" a uma ou mais seqüências de base de dados por uma seqüência pesquisada produzidos pelos algoritmos BLASTN, BLASTP, FASTA, ou similar, alinham e identificam porções similares de seqüências. Os acertos são arrumados em ordem do grau de similaridade e da extensão de sobreposição de seqüência. Acertos a uma seqüência de base de dados representam geralmente uma sobreposição sobre apenas uma fração da extensão da seqüência ou da seqüência pesquisada. O percentual de identidade de uma seqüência de polinucleotídeo ou polipeptídeo é determinado por alinhar as seqüências de polinucleotídeo ou polipeptídeo usando algoritmos apropriados, tais como BLASTN ou BLASTP, respectivamente, ajustados para parâmetros predeterminados; identificar o número de ácidos nucléicos ou aminoácidos idênticos pelas porções alinhadas; dividir o número de ácidos nucléicos ou aminoácidos idênticos pelo número total de ácidos nucléicos ou aminoácidos do polinucleotídeo ou polipeptídeo da presente invenção; e então multiplicar por 100 para determinar a porcentagem de identidade.

Em geral, polipeptídeos e polipeptídeos de fusão de *T. cruzi*, e seqüências e polinucleotídeos que codificam tais polipeptídeos e polipeptídeos de fusão, podem ser preparados usando qualquer um de uma varieda-

de de procedimentos. Por exemplo, biblioteca de cDNA ou DNA genômico de *T. cruzi* pode ser rastreada com grupos de soros de indivíduos infectados por *T. cruzi*. Tais rastreamentos podem ser geralmente realizados usando técnicas bem conhecidas dos versados na técnica, tal como aquelas descritas em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Resumidamente, a biblioteca de bacteriófagos pode ser plaqueada e transferida para filtros. Os filtros podem então ser incubados com soro e uma reagente de detecção. No contexto dessa invenção, um "reagente de detecção" é qualquer composto capaz de se ligar ao complexo anticorpo- antígeno que pode então ser detectado por qualquer um de uma variedade de meios conhecidos daqueles versados na técnica. Reagentes de detecção típicos para finalidades de rastreamento contêm um "agente de ligação" tal como Proteína A, Proteína G, IgG ou lectina, acoplado a um grupo repórter. Grupos repórter preferidos incluem, mas não são limitados a, enzimas, substratos, cofatores, inibidores, corantes, radionuclídeos, grupos luminescentes, grupos fluorescentes e biotina. Mais preferivelmente, o grupo repórter é peroxidase de rábano silvestre (HRP), que pode ser detectada por incubação com um substrato tal como tetrametilbenzidina (TMB) ou ácido 2,2'-azino-di-3-etilbenztiazolina sulfônico. Placas contendo cDNAs que expressam uma proteína que se liga a um anticorpo no soro podem ser isoladas e purificadas por técnicas conhecidas dos versados na técnica. Métodos apropriados podem ser encontrados, por exemplo, em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Alternativamente, polinucleotídeos que codificam polipeptídeos de fusão descritos aqui podem ser amplificados a partir de DNA genômico ou cDNA de *T. cruzi* através de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para essa abordagem, iniciadores seqüência-específicos podem ser desenhados com base na seqüência de nucleotídeo, e podem ser comprados ou sintetizados. Uma porção amplificada das seqüências de DNA pode então ser usada para isolar os clones de cDNA ou genômicos completos usando técnicas bem conhecidas, tal como aquelas descritas em Sambrook *et al.*, *Mole-*

cular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1989).

Polipeptídeos que tem menos que cerca de 100 aminoácidos, e geralmente menos do que cerca de 50 aminoácidos, podem ser sintetizados usando, por exemplo, o método de síntese em fase sólida de Merrifeld, onde aminoácidos são adicionados seqüencialmente a uma cadeia de aminoácido em crescimento. Veja, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc. 85*:2149-2146, 1963. Equipamento para síntese automática de polipeptídeos é disponível comercialmente por fabricantes tal como Perkin Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA.

Polipeptídeos e polipeptídeos de fusão também podem ser produzidos recombinantemente por inserir um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de fusão em um vetor de expressão e expressar o antígeno em um hospedeiro apropriado. Qualquer um de uma variedade de vetores de expressão conhecidos daqueles versados na técnica pode ser empregado. A expressão pode ser obtida em qualquer célula hospedeira apropriada que tenha sido transformada ou transfectada com um vetor de expressão que contém uma molécula de DNA que codifica um polipeptídeo recombinante. Células hospedeiras adequadas incluem células procarióticas, de levedura e eucarióticas superiores. Preferivelmente, as células hospedeiras empregadas são *E. coli*, micobactéria, inseto, levedura ou uma linhagem celular de mamífero tal como COS ou CHO. Os polinucleotídeos expressos dessa maneira podem codificar antígenos de ocorrência natural, porções de antígenos de ocorrência natural, ou outras variantes desses.

Polipeptídeos e polipeptídeos de fusão expressos são geralmente isolados na forma substancialmente pura. Preferivelmente, os polipeptídeos e polipeptídeos de fusão são isolados para uma pureza de pelo menos 80% em peso, mais preferivelmente, para uma pureza de pelo menos 95% em peso, e o mais preferivelmente para uma pureza de pelo menos 99% em peso. Em geral, tal purificação pode ser obtida usando, por exemplo, as técnicas padrão de fracionamento por sulfato de amônio, eletroforese em SDS-PAGE, e cromatografia de afinidade.

A presente invenção ainda fornece métodos para detectar infecção por *T. cruzi* em indivíduos e suprimentos de sangue. Preferivelmente, a infecção pode ser detectada em qualquer amostra biológica que contenha anticorpos. Preferivelmente, a amostra é sangue, soro, plasma, saliva, fluido cerebroespinhal ou urina. Mais preferivelmente, a amostra é uma amostra de sangue ou soro obtida de um paciente ou de um suprimento de sangue. Resumidamente, infecção por *T. cruzi* pode ser detectada usando qualquer um ou mais dos polipeptídeos ou polipeptídeos de fusão descritos acima, ou variantes desses, para determinar a presença ou ausência de anticorpos para o polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão na amostra, em relação a um valor de ponto de corte predeterminado.

Há uma variedade de formatos de ensaio conhecidos dos versados na técnica para usar antígeno purificado para detectar anticorpos em uma amostra. Veja, por exemplo, Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Em uma modalidade preferida, o ensaio envolve o uso de polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão imobilizado sobre um suporte sólido para se ligar e remover o anticorpo da amostra. O anticorpo ligado pode então ser detectado usando um reagente de detecção que se liga ao complexo anticorpo/polipeptídeo de fusão e contém um grupo repórter detectável. Reagentes de detecção adequados incluem anticorpos que se ligam ao complexo de anticorpo/polipeptídeo de fusão e liberam o polipeptídeo marcado com um grupo repórter (por exemplo, em um ensaio semicompetitivo). Alternativamente, um ensaio competitivo pode ser utilizado, no qual um anticorpo que se liga ao polipeptídeo de fusão é marcado com um grupo repórter e deixado se ligar ao antígeno imobilizado após incubação do antígeno com a amostra. A extensão à qual os componentes da amostra inibem a ligação do anticorpo marcado ao polipeptídeo de fusão é indicativa da reatividade da amostra com o polipeptídeo de fusão imobilizado.

O suporte sólido pode ser qualquer material sólido conhecido daqueles versados na técnica ao qual o polipeptídeo de fusão pode ser ligado. Por exemplo, o suporte sólido pode ser um cavidade de teste em uma placa de microtitulação, ou uma membrana de nitrocelulose ou outra mem-

brana adequada. Alternativamente, o suporte pode ser uma esfera ou disco, formado de vidro, fibra de vidro, látex ou um material plástico tal como poliestireno ou polivinilcloreto. O suporte também pode ser uma partícula magnética ou um sensor de fibra óptica, tais como aqueles descritos, por exemplo, na Patente US. N°. 5.359.681.

O polipeptídeo de fusão pode ser ligado ao suporte sólido usando uma variedade de técnicas conhecidas daqueles versados na técnica, que são amplamente descritas na literatura de patente ou científica. No contexto da presente invenção, o termo "ligado" refere-se tanto a associação não covalente, tal como adsorção, como a ligação covalente (que pode ser uma ligação direta entre o antígeno e grupos funcionais sobre o suporte ou pode ser uma ligação por meio de um agente reticulador). Ligação por adsorção a um cavidade em uma placa de microtitulação ou a uma membrana é preferida. Em tais casos, a adsorção pode ser obtida por colocar o polipeptídeo em contato, em um tampão adequado, com o suporte sólido por uma quantidade suficiente de tempo. O tempo de contato varia com a temperatura, mas está tipicamente entre cerca de 1 hora e 1 dia. Em geral, colocar um cavidade de uma placa de microtitulação (tal como poliestireno ou polivinilcloreto) em contato com uma quantidade de polipeptídeo de fusão que varia de cerca de 10 ng a cerca de 1 µg, e preferivelmente cerca de 100 ng, é suficiente para ligar uma quantidade suficiente de antígeno. A nitrocelulose ligará aproximadamente 100 µg de proteína por cm^3.

Ligação covalente do polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão a um suporte sólido pode geralmente ser obtida por reagir primeiro o suporte com um reagente bifuncional que reagirá tanto com o suporte como com um grupo funcional, tal como grupo hidroxila ou amino, sobre o polipeptídeo de fusão. Por exemplo, o polipeptídeo de fusão pode ser ligado a suportes que têm um revestimento de polímero apropriado usando benzoquinona ou por condensação de um grupo de aldeído sobre o suporte com uma amina e um hidrogênio ativo no polipeptídeo de fusão (veja, por exemplo, Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook (1991) em A12-A13).

Em certas modalidades, o ensaio é um ensaio imunoabsorvente

ligado à enzima (ELISA). Esse ensaio pode ser realizado por colocar em contato primeiro um polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão que foi imobilizado em um suporte sólido, comumente o cavidade de uma placa de microtitulação, com a amostra, tal que anticorpos para o polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão dentro da amostra sejam deixados ligar ao polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão imobilizado. Amostra não ligada é então removida do polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão imobilizado e um reagente de detecção capaz de se ligar ao complexo anticorpo-polipeptídeo imobilizado é adicionado. A quantidade de reagente de detecção que permanece ligada ao suporte sólido é então determinada usando um método apropriado para o reagente de detecção específico.

Uma vez que o polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão é imobilizado sobre o suporte, os sítios de ligação de proteína remanescentes sobre o suporte são tipicamente bloqueados usando qualquer agente de bloqueio adequado conhecidos nos versados na técnica, tal como albumina sérica bovina ou Tween 20® (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). O polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão imobilizado é então incubado com a amostra, e o anticorpo (se presente na amostra) é deixado se ligar ao antígeno. A amostra pode ser diluída com um diluente adequado, tal como salina tamponada com fosfato (PBS) antes da incubação. Em geral, um tempo de contato apropriado (isto é, tempo de incubação) é aquele período de tempo que é suficiente para detectar a presença de anticorpo para *T. cruzi* dentro de uma amostra infectada por *T. cruzi*. Preferivelmente, o tempo de contato é suficiente para obter um nível de ligação que é de pelo menos 95% daquele obtido no equilíbrio entre anticorpo ligado e não ligado. Aqueles versados na técnica reconhecerão que o tempo necessário para atingir o equilíbrio pode ser facilmente determinado por testar o nível de ligação que ocorre em um período de tempo. Em temperatura ambiente, um tempo de incubação de cerca de 30 minutos é geralmente suficiente.

Amostra não ligada pode então ser removida por lavar o suporte sólido com um tampão apropriado, tal como PBS contando 0,1% de Tween 20®. Reagente de detecção pode então ser adicionado ao suporte sólido.

Um reagente de detecção apropriado é qualquer composto que se liga ao complexo de anticorpo-polipeptídeo imobilizado e que pode ser detectado por qualquer um de uma variedade de meios conhecidos daqueles versados na técnica. Preferivelmente, o reagente de detecção contém um agente de ligação (tal como, por exemplo, Proteína A, Proteína G, imunoglobulina, lectina ou antígeno livre) conjugado a um grupo repórter. Grupos repórter preferidos incluem enzimas (tal como peroxidase de rábano silvestre), substratos, cofatores, inibidores, corantes, radionuclídeos, grupos luminescentes, grupos fluorescentes e biotina. A conjugação de agente de ligação a um grupo repórter pode ser obtida usando métodos padrão conhecidos daqueles versados na técnica. Agentes de ligação comuns conjugados a uma variedade de grupos repórter também podem ser comprados de diversas fontes (por exemplo, Zymed Laboratories, São Francisco CA e Pierce, Rockford, IL).

O reagente de detecção é então incubado com o complexo anticorpo-polipeptídeo imobilizado por uma quantidade de tempo suficiente para detectar o anticorpo ligado. Uma quantidade apropriada de tempo pode geralmente ser determinada a partir das instruções do fabricante ou por testar o nível de ligação que ocorre em um período de tempo. Reagente de detecção não ligado é então removido e o reagente de detecção ligado é detectado usando o grupo repórter. O método empregado para detectar o grupo repórter depende da natureza do grupo repórter. Para grupos radioativos, contagem de cintilação ou métodos auto-radiográficos são geralmente apropriados. Métodos espectroscópicos podem ser usados para detectar corantes, grupos luminescentes e grupos fluorescentes. Biotina pode ser detectara usando avidina, acoplada um grupo repórter diferente (comumente um grupo radioativo ou fluorescente ou uma enzima). Grupos repórter enzimáticos podem geralmente ser detectados pela adição de substrato (geralmente por um período de tempo específico), seguido por análise espectroscópica ou outra análise dos produtos de reação.

Para determinar a presença ou ausência de anticorpos para *T. cruzi* na amostra, o sinal detectado do grupo repórter que permanece ligado ao suporte sólido é geralmente comparado com um sinal que corresponde a

um valor de ponto de corte predeterminado. Esse valor de ponto de corte é preferivelmente a média do sinal médio obtido quando o antígeno imobilizado é incubado com amostras de um paciente não infectado. Em geral, uma amostra que gera um sinal que está três desvios padrão acima da média é considerada positiva para anticorpos de *T. cruzi* e infecção por *T. cruzi.* Em uma modalidade alternativa preferida, o valor de ponto de corte é determinado usando um Receiver Operator Curve, de acordo com os métodos de Sackett *et al.*, *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, p. 106-7 (Little Brown and Co., 1985). Resumidamente, nessa modalidade, o valor de ponto de corte pode ser determinado a partir de um gráfico de pares de taxas de verdadeiros positivos (isto é, sensibilidade) e taxas de falsos positivos (especificidade-100%) que correspondem a cada valor de ponto de corte possível para o resultado do teste diagnóstico. O valor de ponto de corte no gráfico que é o mais próximo ao canto superior esquerdo (isto é, o valor que abrange a maior área) é o valor de ponto de corte mais preciso, e uma amostra que gera um sinal que é maior do que o valor de ponto de corte determinado por esse método pode ser considerada positiva. Alternativamente, o valor de ponto de corte pode ser deslocado para a esquerda do gráfico, para minimizar taxa de falso positivo, ou para a direita, para minimizar a taxa de falso negativo. Em geral, uma amostra que gera um sinal que maior do que o valor de ponto de corte determinado por esse método é considerada positiva para infecção por *T. cruzi.*

Em uma modalidade relacionada, o ensaio é realizado em um formato de teste "flow-through" ou de fita, em que o polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão é imobilizado em uma membrana tal como nitrocelulose. No teste de "flow-through" anticorpos dentro da amostra se ligam ao polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão imobilizado conforme a amostra passa através da membrana. Um reagente de detecção (por exemplo, proteína A-ouro coloidal) então se liga ao complexo de anticorpo-polipeptídeo conforme a solução que contém o reagente de detecção flui através da membrana. A detecção de reagente de detecção ligado pode então ser realizada como descrito acima. No formato de teste em fita, uma extremidade da membrana a qual o

polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão está ligado é imersa em uma solução que contém a amostra. A amostra migra ao longo da membrana através de uma região que contém reagente de detecção e para a área de polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão imobilizado. A concentração do reagente de detecção no polipeptídeo ou polipeptídeo de fusão indica a presença de anticorpos para *T. cruzi* na amostra. Tais testes podem ser realizados tipicamente com uma quantidade muito pequena (por exemplo, uma gota) de soro ou sangue do paciente.

Em ainda outro aspecto dessa invenção, são fornecidos métodos para detectar *T. cruzi* em uma amostra biológica usando anticorpos monoespecíficos (que podem ser policlonais ou monoclonais) para um ou mais polipeptídeos ou polipeptídeos de fusão de *T. cruzi*. Anticorpos para polipeptídeos purificados ou sintetizados podem ser preparados por qualquer uma de uma variedade de técnicas conhecidas dos versados na técnica. Veja, por exemplo, Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Em uma de tal técnica, um imunógeno que compreende o polipeptídeo antigênico é inicialmente injetado em qualquer um de uma grande variedade de mamíferos (por exemplo, camundongos, ratos, coelhos, ovelha e cabras). Nessa etapa, os polipeptídeos dessa invenção podem servir como o imunógeno sem modificação. Alternativamente, particularmente para polipeptídeos relativamente curtos, uma resposta imune superior pode ser criada se o polipeptídeo estiver ligado a uma proteína transportadora, tal como albumina sérica bovina ou hemocianina de "keyhole limpet". O imunógeno é injetado no animal hospedeiro, preferivelmente de acordo com um esquema predeterminado que incorpora uma ou mais imunizações de reforço, e os animais têm sangue retirado periodicamente. Anticorpos policlonais específicos para o polipeptídeo podem ser então purificados a partir de tais antisoros, por exemplo, por cromatografia de afinidade usando o polipeptídeo acoplado a um suporte sólido adequado.

Anticorpos monoclonais específicos para o polipeptídeo antigênico de interesse podem ser preparados, por exemplo, usando a técnica de Kohler & Milstein, *Eur. J. Immunol. 6*:511-519, 1976, e melhorias a ela. Re-

sumidamente, esses métodos envolvem a preparação de linhagens celulares imortais capazes de produzir anticorpos que têm a especificidade desejada (isto é, reatividade com o polipeptídeo de interesse). Tais linhagens celulares podem ser produzidas, por exemplo, a partir de células esplênicas obtidas de um animal imunizado como descrito acima. As células esplênicas são então imortalizadas, por exemplo, por fusão com um parceiro de fusão de célula de mieloma, preferivelmente uma que é singeneica ao animal imunizado. Uma variedade de técnicas de fusão pode ser empregada. Por exemplo, as células esplênicas e células de mieloma podem ser combinadas com um detergente não-iônico por alguns minutos e então plaqueadas em uma baixa densidade em um meio seletivo que suporta o crescimento de células híbridas, mas não células de mieloma. Uma técnica de seleção preferida usa seleção por HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Após tempo suficiente, geralmente cerca de 1 a 2 semanas, colônias de híbridos são observadas. Colônias únicas são selecionadas e testadas quanto a atividade de ligação contra o polipeptídeo. Hibridomas que tem alta reatividade e especificidade são preferidos.

Anticorpos monoclonais podem ser isolados dos sobrenadantes das colônias de hibridoma em crescimento. Além disso, várias técnicas podem ser empregadas para aumentar o rendimento, tal como injeção da linhagem celular de hibridoma na cavidade peritoneal de um hospedeiro vertebrado adequado, tal como um camundongo. Anticorpos monoclonais podem então ser coletados do fluido de ascite ou do sangue. Contaminantes podem ser removidos dos anticorpos por técnicas convencionais, tal como cromatografia, filtração em gel, precipitação e extração.

Anticorpos monoespecíficos para epítopos de um ou mais dos polipeptídeos ou polipeptídeos de fusão aqui descritos podem ser usados para detectar infecção por *T. cruzi* em uma amostra biológica usando qualquer um de uma variedade de imunoensaios, que podem ser diretos ou competitivos. Amostras biológicas adequadas para uso nesse aspecto da presente invenção são como descritas acima. Resumidamente, em um formato de ensaio direto, um anticorpo monoespecífico pode ser imobilizado

sobre um suporte sólido (como descrito acima) e colocado em contato com a amostra a ser testada. Após remoção da amostra não ligada, um segundo anticorpo monoespecífico, que foi marcado com um grupo repórter, pode ser adicionado e usado para detectar antígeno ligado. Em um ensaio competitivo exemplar, a amostra pode ser combinada com o anticorpo monoclonal ou policlonal, que foi marcado com um grupo repórter adequado. A mistura de amostra e anticorpo pode então ser combinada com um antígeno de polipeptídeo imobilizado em um suporte sólido adequado. Anticorpo que não se ligou a um antígeno na amostra é deixado ligar ao antígeno imobilizado, e o restante da amostra e do anticorpo são removidos. O nível de anticorpo ligado ao suporte sólido é inversamente relacionado ao nível de antígeno na amostra. Dessa forma, um menor nível de anticorpo ligado ao suporte sólido indica a presença de *T. cruzi* na amostra. Para determinar a presença ou ausência de infecção por *T. cruzi*, o sinal detectado do grupo repórter que permanece ligado ao suporte sólido é geralmente comparado a um sinal que corresponde a um valor de ponto de corte predeterminado. Tais valores de ponto de corte podem ser geralmente determinados como descrito acima. Qualquer um dos grupos repórter discutidos acima no contexto de ELISAs podem ser usados para marcar os anticorpos monoespecíficos, e a ligação pode ser detectada por qualquer uma de uma variedade de técnicas apropriadas para o grupo repórter empregado. Outros formatos para usar anticorpos monoespecíficos para detectar *T. cruzi* em uma amostra ficarão claros para aqueles versados na técnica, e os formatos acima são fornecidos apenas para fins exemplares.

Em outro aspecto dessa invenção, são fornecidas composições para a prevenção ou tratamento de infecção por *T. cruzi*, e complicações dessa, em um mamífero. Tais composições compreendem geralmente um ou mais polipeptídeos de fusão descritos aqui, junto com pelo menos um componente selecionado a partir do grupo que consiste em: veículos e imunoestimulantes fisiologicamente aceitáveis.

Vias e freqüência de administração e doses de polipeptídeo de fusão variarão de indivíduo para indivíduo e podem corresponder àquelas

atualmente sendo usadas em imunização contra outras infecções por protozoários. Em geral, as composições podem ser administradas por injeção (por exemplo, intracutânea, intramuscular, intravenosa ou subcutânea), intranasalmente (por exemplo, por aspiração), transdermicamente, oralmente, ou por emplastro transcutâneo como descrito, por exemplo, nas Patentes US 5.910.306 e 5.980.898, as descrições das quais estão por meios dessa incorporadas por referência. Entre 1 e 4 doses podem ser administradas por um período de 2-6 semanas. Preferivelmente, duas doses são administradas, com a segunda dose 2-4 semanas após a primeira. Uma dose adequada é uma quantidade de polipeptídeo de fusão que é eficaz para criar anticorpos em um animal tratado que são suficientes para proteger o mamífero de infecção por *T. cruzi* por um período de tempo. Em geral, a quantidade de polipeptídeo de fusão presente em uma dose varia de cerca de 1 pg a cerca de 100 mg por kg de hospedeiro, tipicamente de cerca de 10 pg a cerca de 1 mg, e preferivelmente de cerca de 100 pg a cerca de 1 µg. Medidas de doses adequadas irão variar com o tamanho do animal, mas variarão tipicamente de cerca de 0,01 mL a cerca de 5 mL para animal de 10-60 kg.

Embora qualquer veículo adequado conhecido daqueles versados na técnica possa ser empregado nas composições dessa invenção, o tipo de veículo variará dependendo do modo de administração. Para administração parenteral, tal como injeção subcutânea, o veículo compreende preferivelmente água, salina, álcool, uma gordura, uma cera, ou um tampão. Para administração oral, qualquer um dos veículos acima ou um veículo sólido tal como manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, celulose, glicose, sacarose, e carbonato de magnésio pode ser empregado. Microesferas biodegradáveis (por exemplo, galactídeo polilático) também podem ser empregadas como veículos para as composições farmacêuticas dessa invenção. Microesferas biodegradáveis adequadas são descritas, por exemplo, nas Patentes US N^{os}. 4.897.268 e 5.075.109.

Qualquer um de uma variedade de imunoestimulantes pode ser empregado nas composições dessa invenção para aumentar inespecificamente a resposta imune. A maioria dos adjuvantes contêm uma substância

feita para proteger o antígeno de rápido catabolismo, tal como hidróxido de alumínio, ou óleo mineral, e um estimulante inespecífico de respostas imunes, tal como lipídeo A, *Bortadella pertussis* ou *Mycobacterium tuberculosis*. Adjuvantes adequados são comumente disponíveis comercialmente, como por exemplo, Adjuvante de Freund Incompleto e Adjuvante de Freund Completo (Difco Laboratories) e Adjuvante Merck 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ). Outros adjuvantes adequados incluem alume, microesferas biodegradáveis, monofosforil lipídio A e quil A.

Os seguintes exemplos são oferecidos como forma de ilustração e não como forma de limitação.

Exemplo 1

Desenho e Preparação de um Polipeptídeo de Fusão Multiepítopo

Estudos de expressão sorológica empregando soros infectados por *T. cruzi* do México e América Central que mostram pouca ou nenhuma reatividade com a proteína de fusão de *T. cruzi* TcF (SEQ ID NO: 1) foram realizados para identificar antígenos de *T. cruzi* conhecidos que complementarão TcF com o objetivo de alcançar alta sensibilidade e especificidade. TcF (SEQ ID NO: 1), SAPA (SEQ ID NO: 2), Pep30 (SEQ ID NO: 3) e Pep36 (SEQ ID NO: 4) foram descobertos ter especificidade muito boa e complementar um ao outro em amostras onde a reatividade de TcF é baixa ou zero.

Seguindo esses estudos, um polipeptídeo de fusão contendo as seqüências de TcF, Pep30, Pep36 e SAPA foi preparada em duas etapas.

Na etapa um, SAPA, Pep30 e Pep36 foram fundidos junto com sítios de restrição de EcoRI e XhoI para fornecer a seqüência de polipeptídeo de SEQ ID NO: 9 (referida como SAPA3036; seqüência de DNA para expressão em *E. coli* fornecida em SEQ ID NO: 10) e clonada em um vetor relacionado a pUC usando técnicas padrão. Na etapa dois, SAPA3036 foi digerida com EcoRI e Xho1, e subclonada na extremidade 3' de TcF (SEQ ID NO: 1). A seqüência de aminoácido do polipeptídeo de fusão resultante (referido como ITC-6) é fornecida em SEQ ID NO: 8, com a seqüência de DNA correspondente sendo fornecida em SEQ ID NO: 11. Após verificação da seqüência, a expressão foi realizada na cepa de *E. coli* Rosetta® pLysS (Novagen, Madi-

son, Wisconsin). O polipeptídeo de fusão ITC-6 tem flexibilidade suficiente ao nível de DNA para inserção de outros epítopos antigênicos, tal como a seqüência específica de *T. cruzi* KMP-11c (SEQ ID NO: 5; Thomas *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* 123:465-471, 2001), a seqüência de Peptídeo 1 (SEQ ID NO: 6) e a seqüência de Peptídeo 1 modificada (SEQ ID NO: 7).

Oligonucleotídeos (SEQ ID NO: 12 e 13) foram desenhados para PCR para a proteína de fusão SAPA3036 para clonar diretamente no vetor pET28 a fim de checar a expressão e viabilidade sem o componente de TcF. O produto de PCR resultante foi digerido com Nde1 e Xho1 antes de clonar em pET28. Não houve problema com a expressão de SAPA3036 sem TcF.

É previsto que a ordem dos peptídeos no polipeptídeo de fusão recombinante ITC-6 poderia ser alterada sem alterar significativamente a atividade do polipeptídeo. Ainda, a inclusão de uma ligação Gly-Cys-Gly entre os peptídeos pode aumentar a ligação à fase sólida sem afetar significativamente a atividade do polipeptídeo.

Exemplo 2

Detecção de Infecção por T. cruzi em Soros usando ITC7.1 e ITC 7.2

A reatividade de soros de indivíduos infectados por *T. cruzi* e soros de controle de indivíduos não infectados contra os polipeptídeos de fusão TcF e ITC-6 foi determinada por ELISA usando o procedimento descrito acima. Os resultados desse estudo são mostrados na figura 1. Todos os soros infectados por *T. cruzi* RR39, 40218, 63221, PMT201-13, RR66, 40219, 74043 e PMT201-9 haviam mostrado ser positivos para *T. cruzi* por ensaio de imunoradioprecipitação (RIPA). O soro 63225 é consenso positivo, com o estado de RIPA sendo equívoco. NHS86, NHS92 e PMT201-15 são todos soros normais. Os soros 197001, 312001, 38001 e 505001 são todos de indivíduos infectados com leishmaniose visceral (VL). Os soros foram testados em uma diluição final de 1/100. Anti-IgG humana-HRP foi usado para detecção seguido pelo substrato TMB. Como pode ser visto a partir da figura 1, ITC-6 é capaz de reconhecer soros que são negativos ou baixos com TcF.

Em estudos subseqüentes, as reatividades de 56 soros (Cruz Vermelha Americana, 42; BBI 14) dos EUA, America Central e do Sul previ-

amente determinados positivos por RIPA, e quatro soros endêmicos de controle do México e países da América Central foram testados contra os TcF e ITC-6 recombinantes por ELISA. O estado de RIPA dos soros individuais é mostrado na Tabela 1 abaixo. A concentração de revestimento foi 100 ng por cavidade. Todos os soros foram testados a uma diluição final de 1/100. Após a incubação, os ensaios foram desenvolvidos usando anti-IgG humano-HRP e substrato de TMB.

Os resultados desses estudos são mostrados na figura 2A-C. Conforme previsto, ITC-6 detectou soros infectados por *T. cruzi* muito melhor do que TcF. Todos os soros endêmicos de controle eram negativos com TcF e ITC-6. Por causa da interferência e reatividade cruzada muito baixas com TcF e ITC-6, esses podem ser usados mesmo a 200 ng por cavidade. Embora houvesse 100% de concordância com RIPA, com alguns soros (mistura de RR e mistura de Teragenix), a OD era baixa. Essas são misturas de soros de título muito baixo e, portanto representam diluições de soros individuais que foram subseqüentemente usadas em rastreamento de expressão sorológica por antígenos adicionais. Nesses casos, é provável que o uso de outros peptídeos, tais como KMP-11 e peptídeo 1, em combinação com ITC-6 produza OD mais alta.

Tabela 1: Estado de RIPA de diferentes soros da América do Norte, do Sul e Central.

Número de Série	ID do soro	Estado de RIPA
RR115	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR99	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR148	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR131	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR52	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR167	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR111	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR71	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR161	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR78	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR04	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR38	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR182	*T. cruzi(ARC)*	Pos

Número de Série	ID do soro	Estado de RIPA
RR102	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR112	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR164	*T. cruzi(ARC)*	Pos
CRR94	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR119	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR86	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR85	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR34	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR109	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR73	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR190	*T. cruzi(ARC)*	Pos
CRR101	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR171	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR128	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR105	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR172	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR174	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR150	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR181	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR75	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR57	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR107	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR39	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR189	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR163	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR158	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR157	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR26	*T. cruzi(ARC)*	Pos
RR94	*T. cruzi(ARC)*	Pos
PMT201-1	*T. cruzi(BBI)*	Pos
PMT201-2	*T. cruzi(BBI)*	Pos
PMT201-3	*T. cruzi(BBI)*	Pos
PMT201-4	*T. cruz(BBI)*	Pos
PMT201-5	*T. cruz(BBI)*	Pos
PMT201-6	*T. cruzi(BBI)*	Pos
PMT201-7	*T. cruzi(BBI)*	Pos
PMT201-8	*T. cruzi(BBI)*	Pos
PMT201-9	*T. cruz(BBI)*	Pos
PMT201-10	*T. cruz(BBI)*	Pos
PMT201-11	*T. cruzi(BBI)*	Pos
PMT201-12	*T. cruz(BBI)*	Pos
PMT201-13	*T. cruzi(BBI)*	Pos

Número de Série	ID do soro	Estado de RIPA
PMT201-14	*T. cruzi(BBI)*	Pos
PMT201-15	Soro de controle (BBI)	Neg
NHS1	Soro de controle	neg
NHS2	Soro de controle	neg
NHS3	Soro de controle	neg
	Controle positivo fraco de *T. cruzi*	RR usado em clonagem de expressão
	Controle positivo fraco de *T. cruzi* I	*T. cruzi* de Mistura de Teragenix usado em clonagem de expressão

Na figura 3, as reatividades de TcF e ITC-6 são comparadas com aquelas de ITC-7.1 e 7.2 em um painel de soros. ITC-7.1 e 7.2 contêm uma e duas repetições da seqüência de KMP-11 específica de *T. cruzi*. Os ensaios foram realizados conforme descrito acima. A reatividade desses soros com TcF, ITC-6, ITC-7.1 e 7.2 são comparadas na figura 3. Os construtos ITC-7.1 e 7.2 mostraram atividade comparável a ITC-6 com indicações de sinal possivelmente maior.

Exemplo 3

Detecção de Infecção por T cruzi em Soros usando ITC 7.2 e ITC 8.2

Proteína recombinante para ITC8.2 (SEQ ID NO: 19) foi expressa como descrito no Exemplo 6 abaixo. Essa proteína foi então usada como o antígeno de fase sólida em um ensaio de ELISA e comparada com ITC7.2 (SEQ ID NO: 17) que difere de ITC8.2 por não incorporar o peptídeo 1 (SEQ ID NO: 6). Incluído no grupo estava uma amostra de soro (amostra n°. 7190014) que era conhecida por reagir com peptídeo assim como com outros componentes das proteínas recombinantes multiepítopo. Os resultados desse estudo são mostrados na figura 4. Conforme mostrado, atividade comparável foi vista com ITC8.2 e ITC7.2.

Para garantir que o peptídeo 1 seja de fato funcional em ITC8.1 (contendo a forma curta do peptídeo 1 fornecida em SEQ ID NO: 7) e ITC8.2 (contendo o peptídeo 1 de extensão completa fornecido em SEQ ID NO: 6), estudos de absorção foram realizados com um soro reativo com peptídeo 1 conhecido (amostra n°. 7190014, da Universidade do Chile) absorvido com esferas revestidas com ITC7.2. A preparação de esferas revestidas com ITC7.2 tratadas com soro n° 7190014 foi realizada como segue:

1) 100 µl de esferas revestidas com ITC-7.2 foram centrifugados a 2000 rpm por 1 min.

2) O tampão do sobrenadante foi cuidadosamente removido e amostra de soro n°. 7190014 diluída a 1/10 em Tris 10 mM, pH 8.0 foi adicionada às esferas revestidas com ITC7.2.

3) A mistura foi gentilmente agitada por aproximadamente 1 hora a RT.

4) O tubo da mistura foi centrifugado novamente a 2000 rpm por 1 minuto.

5) O sobrenadante foi ainda diluído para uma diluição de 1/20 e 1/100 com Tampão de Diluição de Amostra (SDB) para IgG, EDTA 15 mM. Soro não tratado n° 7190014 também foi diluído diretamente para 1/20 e 1/100 em tampão de diluição de soro.

Todas as amostras foram então testadas em um ELISA com 100 L por cavidade de soros diluídos sendo adicionados a fitas de microtitulação (3,12 ng/cavidade) revestidas de ITC7.2, ITC8.1 encurtado (SEQ ID NO: 22) e ITC8.2 (SEQ ID NO: 19). ELISA para *T. cruzi* foi realizado como descrito acima no Exemplo 1. A figura 5 mostra a atividade de soros positivos para peptídeo 1 não absorvidos e absorvidos. Reatividade de peptídeo 1 residual foi observada apenas em ITC8.2, indicando que a forma encurtada do peptídeo 1 em ITC8.1 foi não reativa ou foi menos ativa do que a seqüência maior de peptídeo 1 presente em ITC8.2.

Exemplo 4

Imunoblot com proteínas ITC Recombinantes

Imunoblots de ouro coloidal foram realizados para determinar se proteínas recombinantes ITC-6 e ITC7.2 detectaram soros positivos para *T. cruzi* que eram pouco reativos ou negativos pela proteína TcF recombinante de origem. Também foram testadas 12 amostras de soro de leishmaniose visceral (VL) e soros de quatro doadores normais. Os dados são mostrados na Tabela 2 abaixo.

Resumidamente, as proteínas recombinantes foram pulverizadas em nitrocelulose bloqueada com leite em pó desnatado, lavada em PBS

Tween e cortada em tiras. As tiras foram incubadas em soro em uma diluição de 1/50 por 15 minutos a 37°C. As tiras foram então lavadas em PBS Tween e incubadas adicionalmente por 6 min em temperatura ambiente com PA-ouro (OD5) com ECL 10%. Os blots foram lavados com PBS Tween 20 e observados quanto a presença ou ausência de uma linha colorida.

Os dados (expressos como intensidade da linha) indicam que tanto ITC6 como ITC7.2 melhoram grandemente a detectabilidade de soros positivos para *T. cruzi* quando comparados com TcF sem especificidade prejudicial como indicado por não haver alteração no perfil de reatividade com soros de VL e de doador normal.

Tabela 2

Amostra	Antígeno		
	ITC 6	ITC 7.2	TcF
74042	++++	++++	±
40222	++	++	±
74044	++++	++++	±
40119	++++	++++	-
40224	++	++	-
74040	++++	++++	+
RR148	-	-	-
RR174	+	+	-
RR115	++	++	±
RR161	+++	+++	-
RR131	+++	+++	±
VL474	-	-	-
VL485	-	-	-
VL487	-	-	-
VL494	-	-	-
VL507	-	-	-
VL461	-	-	-
VL453	-	-	-
VL495	-	-	-
VL494	-	-	-
VL477	-	-	-
VL488	-	-	-
VL505	-	-	-

NHS108	-	-	-
NHS117	-	-	-
NHS126	-	-	-
NHS135	-	-	-

Exemplo 5

DADOS DE TESTE RÁPIDO COM ITC8.2

Imunoensaios rápidos de fluxo lateral foram realizados usando "dipsticks" preparados com ITC8.2 sobre a membrana e comparados com os dados de radioimunoprecipitação, imunofluorescência, Lisado e ELISA de ITC8.2. Os dados comparativos são mostrados na tabela 3 abaixo. Boa correlação foi visa entre todos os formatos de ensaio.

Tabela 3

	ELISA ITC8.2	Título de IFAT	Lisado de ELISA	ELISA de peptídeo 1	RIPA	Dipstick ITC8.2
	3,13 ng/cavidade					
7290140	2,988	320	+	+	+	4+
7290191	2,636	40	+	+	+	3+
7290192	2,785	40	+	+	+	4+
7290083	2,613	40	+	-	+	2+
7290062	1,417	40	+	-	+	1+
7190033	2,713	80	+	+	+	3+
7190024	2,677	40	+	+	+	3+
7190016	2,755	80	+	+	+	3+
7190120(733)	0,055	-	-	-	-	-
7190026	1,966	40	+	+	+	2+
7290129	2,714	20	+	+	+	3+
7290189	1,856	20	+	+	+	1+
7290187	2,436	80	+	+	+	2+
7190012	2,732	160	+	-	+	4+
7190047	2,090	20	+	+	+	2+
7190052	0,060	-	-	-	-	-
7290183	0,574	40	+	-	+	2+
7290147	2,772	+	+	+	+	3+
7190045	2,576	20	+	+	+	4+
7190035	2,432	20	+	+	+	2+
7290144	5,412	+	+	+	+	4+
7190117(736)	0,053	-	-	-	-	+/-
7190114	1,524	80	+		-	1+

7190042	2,426	20	+	+	+	2+
7290146	2,872	160	+	+	+	4+
7190113(755)	0,064	-	-	-	-	-
7290145	2,063	20	+	+	+	2+
7190036	2,515	20	+	+	+	3+
7190119	0,044	80	+	-	-	-
7190116	0,087	320	+	-	-	-
7190115	0,110	20	E	-	-	-
7290190	2,472	160	+	+	+	4+
7190118	0,090	20	E	-	-	+/-
7190014	2,818	40	+	+	+	4+
823	0,051	-	-	-	-	-
838	0,051	-	-	-	-	-
Painel #5	1,576	ND	ND	ND	ND	ND
Painel #6	1,197	ND	ND	ND	ND	ND
Painel #7	0,535	ND	ND	ND	ND	ND

Exemplo 6

Expressão de ITC8.2 em sistema de expressão SUMO e Especificidade Melhorada

Dois sistemas de expressão foram comparados para determinar se expressão melhorada de ITC8.2 era possível e também melhorar em especificidade. Soros positivos e negativos para *T. cruzi,* e um painel de diluição de anticorpo foram usados no ensaio. Soros negativos incluíram soros normais problemáticos. Os sistemas comparados eram a expressão de ITC8.2 sinalizada com hexa-histidina em um vetor pET17 versus um sistema de expressão que usa o sistema de expressão SUMO (sem His Tag; Life Sensors, Inc., Malvern, PA) em que o fragmento SUMO foi cortado com a protease apropriada. Os dados, que são mostrados na Tabela 4, demonstram o potencial para melhora na especificidade obtida quando se usou o sistema recombinante derivado de SUMO versus preparar ITC8.2 hexa-histidina em um vetor pET.

Tabela 4

		ITC8.2 (His Tag)	ITC8.2 (SUMO)
	ELISA	20 min	20 min
7290140	P	4+	4+
7290062	P	1+	2+
7190120(733)	N	-	-

7190052	N	-	-
7290183	P	2+	2+
7190117(736)	N	+/-	-
7190114	P	1+	2+
7190113(755)	N	-	-
7190119	N	-	-
7190116	N	-	-
7190115	N	-	-
7190118	N	+/-?	-
823	N	-	-
838	N	-	-
Chagas D#2	P	4+	4+
Chagas D#4	P	3+	3+
Chagas D#5	P	2.5+	1+
Chagas D#6	P	1.5+	+
BM123204		-	-
BM123207		+/-	-
BM123210		-	-
SeraCare#5		+	-
SeraCare#22		+	-
SeraCare#122		+/-	-
SeraCare#154		+/-	-

Exemplo 7

Seqüências derivadas de clonagem de expressão sorológica

Preparação de biblioteca de *T.cruzi*:

Uma biblioteca genômica de expressão de quebra aleatória foi construída por sonicar DNA genômico de cepa CL de *Trypanosoma cruzi*. A sonicação produziu tamanhos de fragmento 0,5-2,0 kb. Quinze microgramas de DNA sonicado foram tratados com polimerase T4 (NEB) por 15 minutos a 12ºC seguido por incubação por 20 minutos a 75ºC para produzir fragmentos de extremidade cega. Adaptadores de EcoRI foram então ligados aos fragmentos e os adaptadores foram fosforilados com polinucleotídeo quinase de *E. coli*. Os fragmentos foram fracionados a seguir com uma coluna Sephacryl S400 e finalmente ligados a um vetor de expressão Lambda ZAP Express (Stratagene). O vetor ligado foi empacotado com extrato de empacotamento Gigapack III Gold (Stratagene).

Ratreamento:

A biblioteca amplificada foi plaqueada em placas de agarose LB

em uma concentração de 20.000 unidades formadoras de colônia (PFU) por 35 placas. Após incubação a 42°C por 4 horas, filtros de nitrocelulose embebidos em IPTG 10 mM foram adicionados e as placas foram incubadas a 37ºC durante a noite. Os filtros foram removidos e lavados 3x com PBS contendo Tween 20 0,1% (PBST), bloqueados por 1 hora com BSA 1% em PBST, lavados 3x com PBST, bloqueados mais 1 hora com Tween 20 1% em PBS, lavados 3x com PBST e então incubados durante a noite a 4ºC em soro, grupo #1 (mistura de RR) e/ou grupo #2 (mistura de Teragenix) de pacientes. Ambos os grupos de paciente foram obtidos a partir de soros de *T. cruzi* pouco reativos confirmados por RIPA. No dia seguinte, após lavar 3x com PBST, os filtros foram incubados em um anticorpo secundário de cabra anti-Ig humana (IgG, IGA, IgM) com fosfatase alcalina por 1 hora em temperatura ambiente. Os filtros foram finalmente lavados 3x com PBST, 2x com tampão AP e desenvolvidos com BCIP/NBT. Os clones positivos foram purificados usando a mesma técnica. Os fagomídeos foram cortados, e o DNA de plasmídeo resultante foi seqüenciado e pesquisado contra as bases de dados de *T.cruzi.*

Características e resultado de rastreamento da biblioteca:

Vetor lambda:	Lambda Zap Express (Stratagene)
Vetor de plasmídeo:	pBK-CMV (canamicina)
DNA:	*T. cruzi* genômico
Titulação da biblioteca:	$2,5x10^8$/ml (amplificado) (total de 30 ml)
Tamanho do inserto:	0,5-2,0 Kbp (média = 1,1)
Rastreado:	20.000 pfu por 35 placas
Soro:	grupo #1 e grupo #2 de paciente (de doadores normais) diluição 1:200
Seleções primárias:	31 (Ig Humana) do grupo #1 de paciente (de 15 placas)
	47 (Ig Humana) do grupo #2 (de 20 placas)
Secundário purificado:	38 (fraco – sinal forte)
Submetidos para seqüenciamento:	12

Tabela 5: Acertos de rastreamento de biblioteca genômica de *T.cruzi* com soro agrupado de pacientes infectados

Clone	Pontuação	Blastn	Homologia	Tamanho (kDa)	GenBank
Tc-2	1816	Tc00.1047053509181.9	Proteína da família de genes dispersos (pseudogene DGF-1)		M90534 Proteína 1 de DGF-1 de *T. cruzi*
Tc-5	883	Tc00.1047053507757.10	Proteína hipotética	14,2	Nova
Tc-11	3025	Tc00.1047053509181.9	Proteína da família de genes dispersos (pseudogene DGF-1)		M90534 proteína de DGF-1 de *T. cruzi*
Tc-12	3784	Tc00.1047053509181.9	Proteína da família de genes dispersos (pseudogene DGF-1)		M90534 proteína de DGF-1 de *T. cruzi*
Tc-13	2765	Tc00.1047053509181.9	Proteína da família de genes dispersos (pseudogene DGF-1)		M90534 proteína de DGF-1 de *T. cruzi*
Tc-14	2330	Tc00.1047053509659.20	Proteína da família de genes dispersos (pseudogene DGF-1)		M90534 proteína de DGF-1 de *T. cruzi*
Tc-15	3277	Tc00.1407053511211.170	Choque térmico 70	73,2	X58715 RNAm de hsp 70 para HSP de 70 kDa de *T. cruzi*
Tc-19					
Tc-25	2964	Tc00.1407053507713.30	Choque térmico 85	81	M15346 Proteína de choque térmico de 85 kDa de *T.cruzi*
Tc-26	3175	Tc00.1407053510271.20	Proteína da família de genes dispersos (pseudogene DGF-1)		
Tc-27	3362	Tc00.1407053503739.20	trans-sialidase		
Tc-31	3276		Proteína associada ao microtúbulo	125,5	

Seqüências adicionais, referidas como Tc48, Tc60 e Tc70, também foram identificadas. Essas seqüências, mais Tc5, foram de muito interesse para avaliação adicional. As seqüências de DNA para Tc5, Tc48, Tc60 e Tc70 são fornecidas em SEQ ID NO: 23, 25, 28 e 30, respectivamente, com as seqüências de aminoácido para Tc5, Tc60 e Tc70 sendo fornecidas em SEQ ID NO: 24, 29 e 31. A seqüência de aminoácido parcial de *Tc48* é fornecida em SEQ ID NO: 26, com a seqüência de extensão completa correspondente obtida a partir da base de dados pública em SEQ ID NO: 27.

A partir do precedente, será observado que, embora modalidades específicas da invenção tenham sido descritas aqui para a finalidade de ilustração, várias modificações podem ser feitas sem desviar do espírito e escopo da invenção.

SEQ ID NO: 1-31 são demonstradas na Listagem de Seqüência anexada. Os códigos para seqüências de polinucleotídeo de polipeptídeo usados na Listagem de Seqüência anexada conferem com Padrão WIPO ST.25 (1988), Apêndice 2.

Todas as referências descritas aqui, incluindo referências de patente e referências de não-patente, estão por meio desse incorporadas por referência na sua totalidade como se cada uma estivesse incorporada individualmente.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo de fusão, caracterizado pelo fato de que compreende as sequências de aminoácido da SEQ ID NO: 1, 2, 3 e 4.

2. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 5.

3. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 6.

4. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 7.

5. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 8, 15, 17, 19, e 20.

6. Polipeptídeo de fusão, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste nas sequências de SEQ ID NO: 8, 15, 17, 19 ou 20.

7. Sequência de polinucleotídeo isolada, caracterizada pelo fato de que codifica um polipeptídeo de fusão como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Vetor de expressão recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de polinucleotídeo como definida na reivindicação 7.

9. Método para detectar infecção por *T. cruzi* em uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) colocar a amostra biológica em contato com um polipeptídeo de fusão como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6; e

(b) detectar na amostra biológica a presença de anticorpos que se ligam ao polipeptídeo de fusão, assim detectando a infecção por *T. cruzi* na amostra biológica.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo

fato de que a amostra biológica é selecionada a partir do grupo que consiste em: sangue, soro, plasma, saliva, fluido cerebroespinhal e urina.

11. Kit para detectar infecção por *T. cruzi* em uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um polipeptídeo de fusão como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6; e

(b) um reagente de detecção.

12. Kit de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o reagente de detecção compreende um grupo repórter.

13. Kit de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o grupo repórter é selecionado a partir do grupo que consiste em: enzimas, substratos, cofatores, inibidores, corantes, radionuclídeos, grupos luminescentes, grupos fluorescentes, e biotina.

14. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 e pelo menos um componente selecionado a partir do grupo que consiste em veículos e imunoestimulantes fisiologicamente aceitáveis.

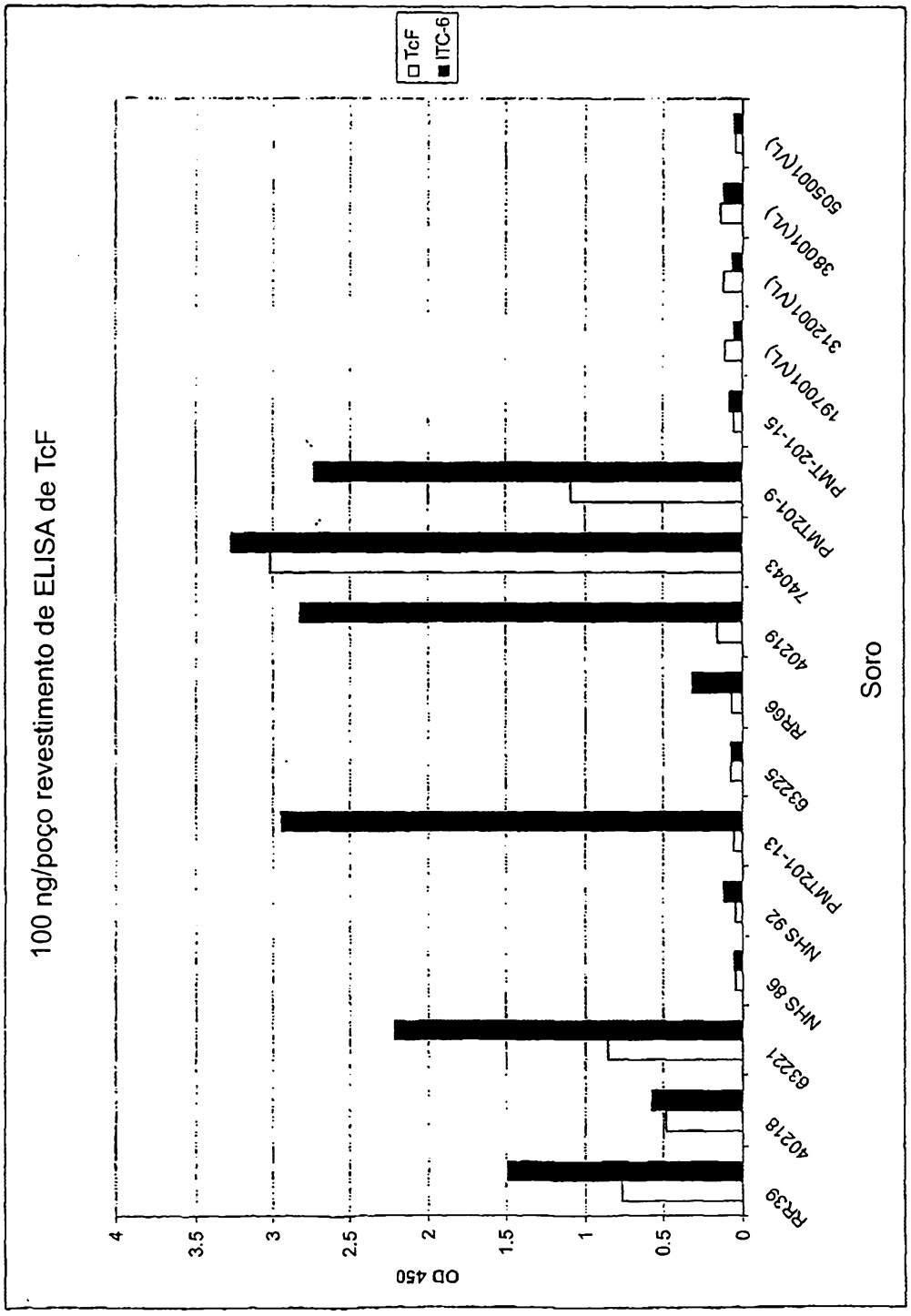

100 ng/poço revestimento de ELISA de TcF
TcF
ITC-6
OD 450
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
RR39
4021 8
63221
NHS 86
NHS 92
PMT201-13
63225
RR66
40219
7404 3
PMT201-9
PMT-201-15
19700 1 (VL)
31200 1 (VL)
38001 (VL)
50500 1 (VL)
Soro

FIG. 1

Fig. 2A

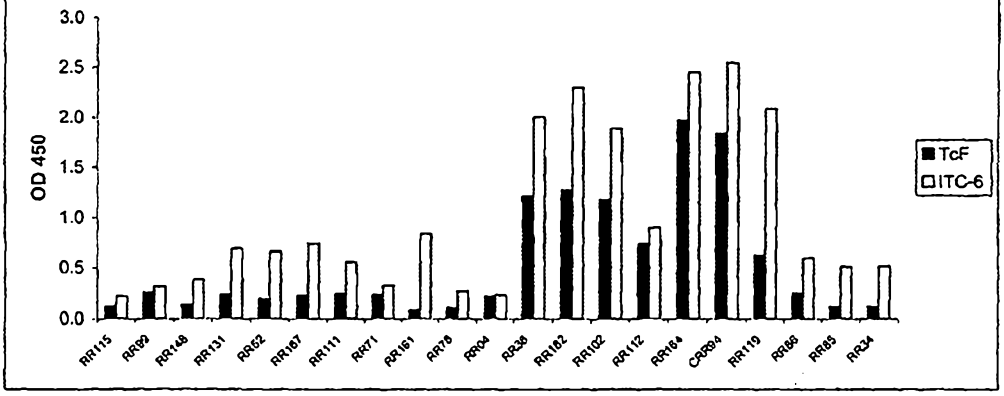


Fig. 2B

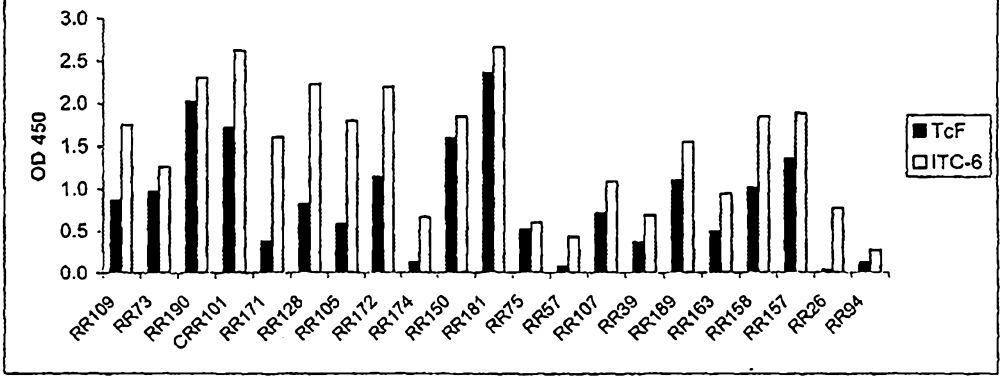


Fig. 2C

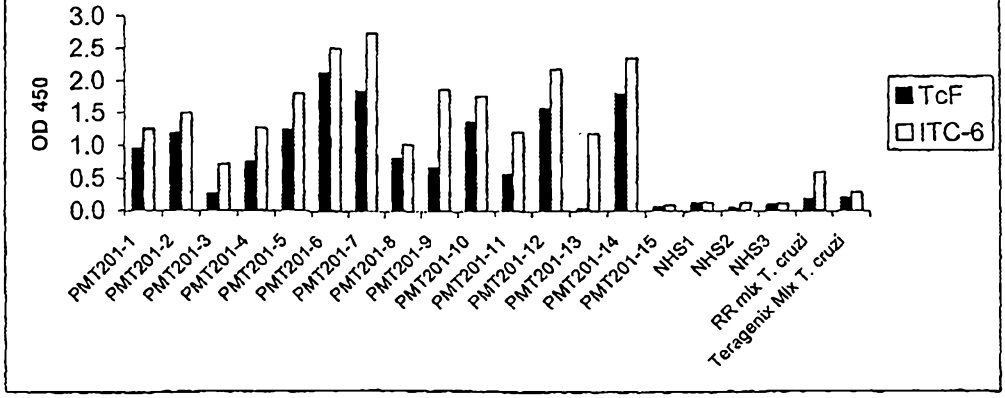


Fig. 3

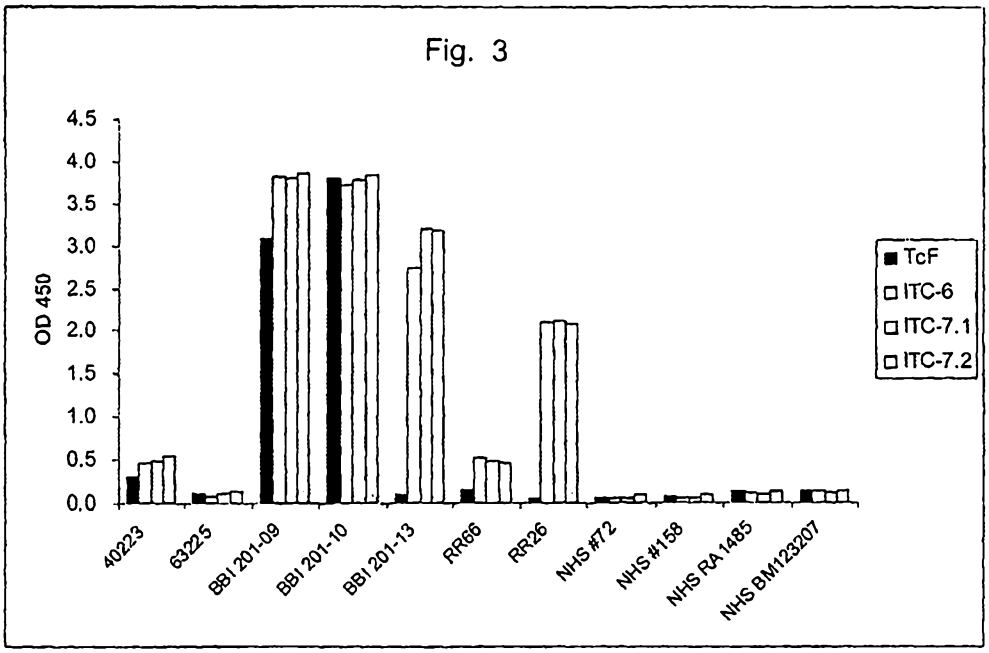

OD 450
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
TcF
ITC-6
ITC-7.1
ITC-7.2
40223
63225
BBI 201-09
BBI 201-10
BBI 201-13
RR66
RR26
NHS #72
NHS #158
NHS RA1485
NHS BM123207

Fig. 4

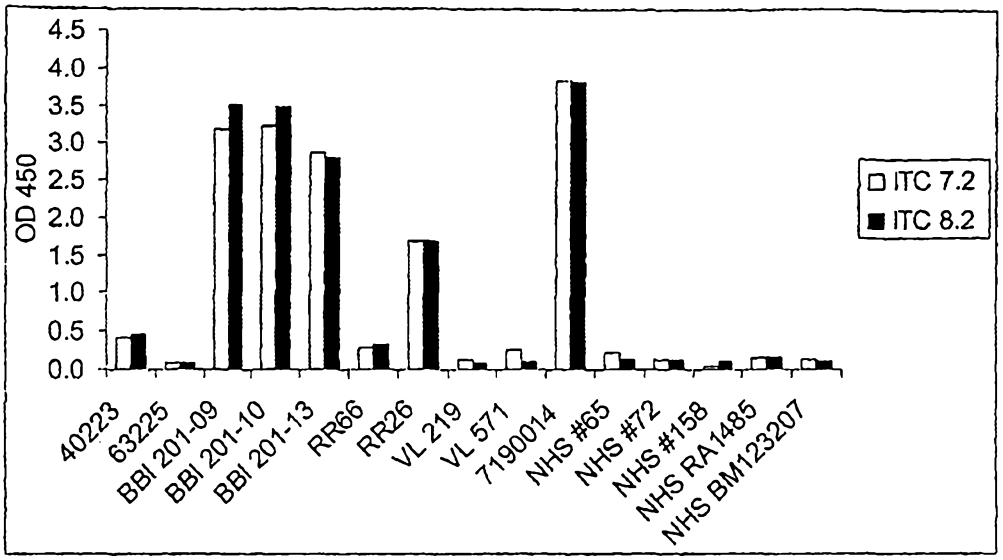

OD 450
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ITC 7.2
ITC 8.2
40223
63225
BBI 201-09
BBI 201-10
BBI 201-13
RR66
RR26
VL 219
VL 571
7190014
NHS #65
NHS #72
NHS #158
NHS RA1485
NHS BM123207

Fig. 5

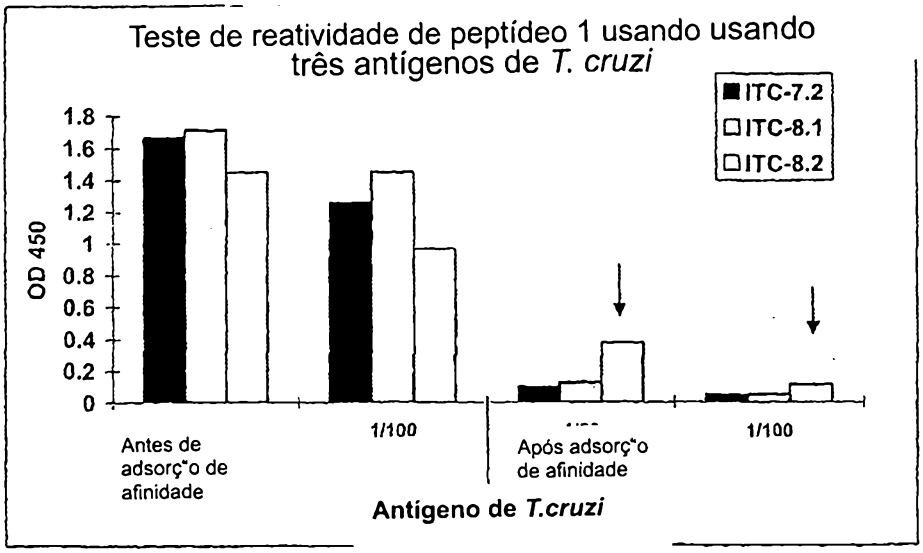

Teste de reatividade de peptídeo 1 usando usando três antígenos de T. cruzi
ITC-7.2
ITC-8.1
ITC-8.2
OD 450
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1/100
1/100
Antes de adsorç"o de afinidade
Após adsorç"o de afinidade
Antígeno de T.cruzi

Fig. 6A

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCG
CGGCAGCCATATGGCCGCAGGCGGAGAGCTGGCGGCAACAGCAGCTG
CAGTGCGGGGACAGTTTGCATCGTGTGCCCGTGGGGGAAGGACGAC
ATGGCGCAGGATGGGCTTCTGGAGGCTGAGCTTTTCACCCCGGTGGA
TGAGAGCCTCTAGTCCAGCAGACGTGCTGAGCATGGGGAGAAGGAGC
TGTGACCGCCCCGTATTTTGGCCTCAGAGCCAGAGTGCACCCTGTCG
AAGGCAAAAAGGGGCGAAGTCGACACAATGCGACTTGTCCACGAAGC
GCTTCTTCCTCCCATGCTCTGGCAGAGGCGTGCCGGGAGGATACTGC
GAACAGTTGCGCTTTTGTTGTTGGCTGTGGTGGCGGGGAGGGCGGAG

T Isso Ø "A" em XM803645
G Isso Ø "A" em XM803645
G Isso Ø "C" em XM803645

Fig. 6B

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAAGGELAATAAAVRGQFASCARGGRTT
WRRMGFWRLSFSPRWMRASSPADVLSMGRRSCDRPVFWPQSQSAPCRR
QKGAKSTQCDLSTKRFFLPCSGRGVPGGYCEQLRFCCWLWWRGGRRG
RLN*

Fig. 7A

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCG
CGGCAGCCATATGCCCAAAAAGACCGGTGGCAAAAAGAAGGGGCAAA
GTTCTCCGGATGGCTCTGAGCCGCGGAAACGAAAGAACAACAAAAAG
GCGACAATGGAGCCGCGGGACGTGGATGAGATGCAGAAGCTGCAGG
AACTTTTAGGGGACGAGGAACAGCCGTTGGGTGTCTCCAAGAAATCG
CTAGAGGGCTTATTGTCCCTTCGGCAGCCGCAGGAGTTGGCGGTGAG
GCTTGCGCAATCTCTCTCCTCCCTGCGCGCGCGGCTTGCGGAGTTGG
AGTTGGAGAGGCTTAACCGTGGGAGCGAGGCGCCGGGGCTGTCGAA
CATCGT...

Fig. 7B

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMPKKTGGKKKGQSSPDGSEPRKRKNNKKA
TMEPRDVDEMQKLQELLGDEEQPLGVSKKSLEGLLSLRQPQELAVRLA
QSLSSLRARLAELELERLNRGSEAPGLSNI...

Fig. 8A

CCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCG
CGCGGCAGCCATATGTGCATTGCTCTTGGCATCGTCGCGGAGGATGAT
GAGGCATGGCGAATTGCCAGCGAGGCTGTCGCTGCAGAAAAGGAGC
CTGTCTTCAGCGGGAACAACGGCCCTTTTGTAGATGTCTGGTTTGGC
GAACAGAAACTCTTTGGCCTCGTTCAACGCGTTGCTCCAAACGACTTT
ATTCAGGTCGCCCAGGAGTGTGGCGAGAAGAGCGATGACGCCGCAG
CGACGTTGCGGATGCGTGTGACGCACAACGTCTCTTTTGTCCTTCACC
TCTCGTCGGTGCCGCATGCGATGCTGCAGGCACGGGGAGCGCCCGA
GGACAAGTTTGTGAACTTCATGCAACTTGTCGTGGATTACGCTTCGCT
GCTGCGGCGCGGGATGAAGGATGAGTTTCTTGGCGTCGATCCCGAGT
CCGATGCGGAGTACATACGCTTCACGCCCCAGTGAAAGCTT

Fig. 8B

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMCIALGIVAEDDEAWRIASEAVAAEKEPVFS
GNNGPFVDVWFGEQKLFGLVQRVAPNDFIQVAQECGEKSDDAAATLRM
RVTHNVSFVLHLSSVPHAMLQARGAPEDKFVNFMQLVVDYASLLRRGM
KDEFLGVDPESDAEYIRFTPQ*

Fig. 9A

CCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCG
CGCGGCAGCCATATGTGTTCCCAATACGGACCCTTGAGGAACTCATCG
CAGCGTGGAAGACCGATCGCTGTGTCTGTTGCCAACTCGTGTCTTCG
CGTAGCGGCCACGCAGAAAGTTTCTAAGCCACCTTCTACAGTTCACC
CCCGGAATATTGGCCGGCAAGCGACTGAGGACTCGATGACCAATGAA
CTCAAAGGCCTTGCTGGAGTCTACCAGCACCAACGGAGCCCGATGGG
GTCTGCAGTGGAGCTGGCTTCCAACACCGCTCTTCCTGGGAAGGTTC
ACTTGGAATTAATCGTTTCTGTTATGCTCAAATTCGTTTATCAGGTGT
GCCAGCTGCATCGTCGTGGTACGCATACTACGGCACGCATACTGGTG
CGGACGAGGCGTCCACAGCCAAAGCAGTCTCCTCAATGCCATTTTCT
CAGCAACCTTACCCACGATGGAAGGACAGCTGATTGGTCGATATGAA
GCTT

Fig. 9B

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMCSQYGPLRNSSQRGRPIAVSVANSCLRVA
ATQKVSKPPSTVHPRNIGRQATEDSMTNELKGLAGVYQHQRSPMGSAVE
LASNTALPGKVHLELIVSVMLKFVYQVCQLHRRGTHTTARILVRTRRPQ
PKQSPQCHFLSNLTHDGRTADWSI*