



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

- PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL -

21. EXPEDIENTE No.

05-32838

54. TITULO

"FLAVOPROTEINA DE TRYPANOSOMA CRUZI, METODO VERMICIDA DE TAMIZAJE
CON EL USO DEL MISMO Y DIAGNOSTICO"

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

C12N 9/02 / 30-2

71. SOLICITANTE

OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE

DOMICILIO

2-4, Furuedai 6-chome, Suita-shi. Osaka-fu. JAPON

74. APODERADO

DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

11 ABR. 2005

22. BOGOTA, D.C.,

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

11-05-05

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I☒ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE

Dirección: 2-4, Furuedai 6-chome, Suita-shi,
Osaka-fu, JAPON

Nacionalidad o Domicilio: Osaka-fu - JAPON

Lugar de Constitución: JAPON

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: Calle 94 A No. 7 A-09

Teléfono: 610 74 20 Fax: 610 07 08

E-mail: mail@elvarrocastellanos.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 39'778.654 TPA

70,819

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: YOSHIHIRO URADE; BRUNO KILUNGA KUBATA; PIUS ZAKAYI KABUTUTU;
TOMOYOSHI, NOZAKIDirección: 603, Granahito-Shimogamo-Shikisakkan, 43, Shimogamo Matsubara-cho, Sakyo-ku,
Kyoto-shi, Kyoto-fu, JAPON; American Embassy to Kenya, United Army Medical Research Unit-
Kenya, p.o.box 608, Village Market, United Nations Avenue, Gigiri, Nairobi, KENYA; 305, Shoel-
hatsu, 2-16-10, Senryamahigashi, Suita-shi, Osaka-fu, JAPON; 4-22-2-114, Hirai, Edogawa-ku,
Tokyo-to, JAPON.

Nacionalidad o Domicilio JAPON, KENYA, JAPON, JAPON

⑤

PCT (88)

Solicitud Internacional No.

PCT/JP2003/013043

Fecha 10/10/2003

Publicación Internacional No.

WO 2004/033675 A1

Fecha 22/04/2004

⑥

Título (54)

"FLAVOPROTEINA DE TRYPANOSOMA CRUZI, METODO VERMICIDA DE TAMIZAJE
CON EL USO DEL MISMO Y DIAGNOSTICO"

⑦

Clasificación Internacional (51)

C12N 8/02, 16/53, C12Q 1/88, 1/28, C07K 16/40, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/566,
33/568

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

JOP

11/10/2002

2002-288284

⑨

Comprobante de pago No.

05-13,559

Fecha

Febrero 21 de 2005

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, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del 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 Opinión Escrita - formato IPEA/408

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

11 ABR. 2005

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:


C.O. No. 39.779.654 Uruquén - TPA 70.819 C.S.J.

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicacion : 05012838 00000000 Folio: 131
Fecha (MS): 2005-04-11 15:40:36
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2029 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 13,559
FECHA : FEBRERO 21 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	37882387	21/02/2005	6,947,880.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) 許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 4 月 22 日 (22.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/033675 A1(51) 国際特許分類: C12N 9/02, 15/53, C12Q 1/68, 1/26,
C07K 16/40, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/566, 33/569

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013043

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 10 日 (10.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

→ 特願 2002-299284

2002 年 10 月 11 日 (11.10.2002) JP

(URADE, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒606-0804 京都府 京都市 左京区下鴨松原町 4-3 グラン・シティオ下鴨四季彩館 503 Kyoto (JP). クバタ ブルーノ・キルンガ (KUBATA, Bruno, Kilunga) [CD/KE]; (NG21) ナイロビンゴング・ロード、ムカイ・ドライブ・オフ、ミモザ・コート、アパートメント 8 Nairobi (KE). カブトゥウ ビウス・ザカイ (KABUTUTU, Plus, Zakay) [CD/JP]; 〒565-0842 大阪府 吹田市 千里山東 2-18-10 ショウエイ・ハイツ 305 号 Osaka (JP). 野崎 智哉 (NOZAKI, Tomoyoshi) [JP/JP]; 〒132-0035 東京都 江戸川区 平井 4-22-2-114 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 1MPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE) [JP/JP]; 〒565-0874 大阪府 吹田市 古江台 6 丁目 2 番 4 号 Osaka (JP). 国立感染症研究所所長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY THE DIRECTOR-GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES) [JP/JP]; 〒162-8640 東京都 新宿区 戸山一丁目 2 番 1 号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): BR, CO, MX, US.

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正 受領の際には再公開される。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 裏出 良博

(54) Title: FLAVIN PROTEIN OF *TRYPANOSOMA CRUZI*, METHOD OF SCREENING VERMICIDE WITH THE USE OF THE SAME AND DIAGNOSTIC

(54) 発明の名称: クルーズトリパノソーマのフラビン蛋白質とそれを用いた駆虫薬スクリーニング方法と診断薬

(57) Abstract: It is intended to provide a method of diagnosing infection with Chagas disease by screening a vermicide for *Trypanosoma cruzi* which is the pathogen of Chagas disease. Using a flavin protein TcOYE specific to *Trypanosoma cruzi*, a vermicide efficacious against *Trypanosoma cruzi* is screened. Using the gene sequence of TcOYE and an antibody therefor, infection with *Trypanosoma cruzi* is diagnosed.

(57) 要約: シャーガス病の病原体であるクルーズトリパノソーマの駆虫薬をスクリーニングし、シャーガス病感染を診断する方法を提供する。クルーズトリパノソーマに特異的なフラビン蛋白質 TcOYE を用いて、クルーズトリパノソーマに有効な駆虫薬をスクリーニングする。さらに、TcOYE の遺伝子配列や抗体を用いて、クルーズトリパノソーマ感染を診断する。

WO 2004/033675 A1

DESCRIPTION

FLAVOPROTEIN OF TRYPANOSOMA CRUZI, METHOD OF SCREENING
VERMICIDE WITH THE USE OF THE SAME AND DIAGNOSTIC

5 TECHNICAL FIELD

The present invention relates to the development of an effective trypanocidal drug for treating *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease) for which no effective treatment is currently available; and to a simple, highly specific
10 diagnostic method. More particularly, the present invention relates to a method of developing a trypanocidal drug effective against *Trypanosoma cruzi*, the pathogen of Chagas' disease, using the flavoprotein TcOYE present in *Trypanosoma cruzi* and its recombinant protein; and of testing for the metabolic rate
15 (degradation activity) of the effective substance.

Furthermore, the invention relates to a simple and specific method of diagnosing *Trypanosoma cruzi* infection using the gene sequence of TcOYE and antibodies thereto.

20 BACKGROUND ART

Chagas' disease is a parasite infection caused by *Trypanosoma cruzi* (World Health Organization, Weekly Epidemiol. Res. 65: 257-264, 1990; Coura J. R. et al., Trends Parasitol., 18: 171-176, 2002; Teixeira, M. M. et al., Trends
25 Parasitol., 18: 262-268, 2002). This protozoa infects various animals other than humans, such as dogs, cats, and armadillo, and is distributed in many states of the US and

all over Central and South America. Infection of human occurs mainly in areas south of Texas and has been reported in 18 countries of Central and South America. The number of cases is estimated at 16 to 18 million, resulting in 21,000 deaths every year, and increasing by 300,000 every year. There are 2,000,000 to 3,000,000 infected patients in the chronic stage, and people in areas at a high risk for infection amount to 120,000,000.

Trypanosoma cruzi, when present in human blood, has large kinetoplasts and is of the trypomastigote type with a C-shaped curved body 18 to 22 μm in length, and it undergoes no division or multiplication. However, in cells of the muscles, the liver, the spleen, and the heart, it is of the atrichous type with a slightly elliptic body 2 to 4 μm in diameter, having large kinetoplasts, and it multiplies by binary fission. This atrichous type can develop into the epimastigote and promastigote types, but it finally develops into the trypomastigote type. When this organism is sucked by the vector assassin bugs, it goes through the atrichous type into the metacyclic *Trypanosoma* type in the body, and is excreted in the feces. It requires about 10 days for development in the insect body.

The vector assassin bug is a relatively large size insect and divided into many known species, and examples of important species include *Triatoma infestans* which is distributed over the southern part of South America including Argentina, *Rhodnius prolixus* distributed over the northern part of South

America, and Central America, and *Panstrongylus megistus* in Brazil. When a person is stung by such insect, it causes severe pain and itching, and infection occurs when the person scratches the sting wound and the *Trypanosoma* in the insect feces excreted on the skin is rubbed into the wound. An assassin bug occurs frequently in a house, and sucks blood at night. Male and female adults, young insects and larvae can be a vector.

When stung by an insect and infected with *Trypanosoma cruzi*, a red boss called chagoma forms at the site. Symptoms appear after a one to two-week latent period. Acute symptoms occur mainly in infants. Such conditions as high fever, eruption, lymphadenitis, hepatosplenomegaly, facial and unilateral, in particular, blepharedema called Romana symptom, myocarditis and meningoencephalitis may occur and sometimes result in death after a disease progress over 2 to 4 weeks. An infant patient who has passed through an acute stage shifts to a chronic stage, while an adult patient tends to go through a chronic course from the beginning. Examples of cardinal symptoms during the chronic stage include myocarditis, cardiac hypertrophy and giant colon.

Diagnosis of Chagas' disease includes, starting with checking for the characteristic symptoms mentioned above, morphological detection of the protozoa using smear/Giemsa stained specimens from blood and lymph node aspiration, the protozoan culture detection method using synthetic culture medium, the animal inoculation method which involves injecting

the sampled material into rats or mice so as to multiply in the body, the vector diagnostic method which involves allowing uninfected assassin bugs to suck blood from a patient then detecting the protozoa that has multiplied in the insect intestine two weeks later, or immunological diagnostic methods such as endodermal reaction, complement fixation reaction, and fluorescent antibody technique. However, any of these methods requires skill and complex procedures, posing sensibility and specificity problems.

10 Nifurtimox and benznidazole have been used as a treatment for Chagas' disease (Docampo, R. & Moreno, S. N. S., FASEB J. 45, p2471-2476, 1986; Henderson, G.B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, p5374-5378, 1988; Docampo, R., Chem. Biol. Interactions, 73, p1-27, 1990). However, these drugs are
 15 effective for only the early infection phase (Braga M.S., et al., Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 42, p157-161, 2000), and nothing is known about the mechanism of action except that the involvement of radicals such as reactive oxygen has been suggested (Boveris, A. R. et al., Biochem J., 175: 431-439,
 20 1978; Boveris, A. et al., Comp. Biochem. Physiol., 61C: 328-329, 1978; Docampo, R. & Stoppani, A.O., Arcch. Biochem. Biophys., 197: 317-321, 1979; Viode, C. N. et al, Biochem. Pharmacol., 57: 549-557, 1999). Besides, they cause strong adverse effects and are carcinogenic. The antimalarial primaquine
 25 is thought to be effective to some extent, but other drugs which are effective in treating African trypanosomiasis and leishmaniasis are ineffective against Chagas' disease and no

9

vaccine for *Trypanosoma cruzi* has been developed. Thus there is no effective drug for treatment of Chagas' disease. Therefore, there is a need worldwide to search for a new target molecule for the development of drugs to address Chagas' disease (World Health Organization TDR news 67: 15, 2002).

Meanwhile, the inventors have indicated the possibilities that parasitic protozoan such as malarial parasite and *Trypanosoma brucei*, the pathogen of African trypanosomiasis, have a metabolic system to biosynthesize prostaglandins (PGs), which possess sleep inducing, vasodilating and immunosuppressing actions, from arachidonic acid, that the PG synthesis system in these protozoans is irresponsive to inhibitors of the mammalian enzyme (cyclooxygenase), and that these protozoans may use PGs to establish parasitism in the host (Kubata B. K. et al., J. Exp. Med. 188: 1197-1202, 1998; Kubata B. K. et al., J. Exp. Med. 192: 1327-1337, 2000). Then, the inventors purified from the soluble fraction of *Trypanosoma brucei* all lysates, *Trypanosoma brucei* PGF synthase enzyme (TbPGFS), which reduces prostaglandin H₂ (PGH₂), the common precursor of various PGs, to prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) and cloned the gene and cDNA thereof, demonstrating that TbPGFS belongs to the aldoketo reductase gene family (Kubata B. K. et al., J. Exp. Med. 192: 1327-1337, 2000). However, it was not made clear whether or not *Trypanosoma cruzi*, which forms a cytozoon, has a PG biosynthetic pathway as malarial parasite and *Trypanosoma*

brucei, which have different infection routes and taxonomical positions.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

5 (Problems to be Solved by the Invention)

It is an object of the present invention to provide a new target molecule for the development of drugs for Chagas' disease as well as to provide a method of screening therapeutic drugs for *Trypanosoma cruzi* infection and a diagnostic.

10 The inventors have conducted intensive studies to achieve the object, and completed the invention based on the findings as follows:

- 1) *Trypanosoma cruzi* also has the metabolic system that biosynthesizes prostaglandin (PG) from arachidonic acid, and
15 the PG synthetic system of this protozoan is not inhibited by inhibitors of the mammalian enzyme (cyclooxygenase). It is very likely that *Trypanosoma cruzi* also uses PG to establish parasitism in the host as *Trypanosoma brucei* does.
- 2) The soluble fraction of *Trypanosoma cruzi* has an enzymatic
20 activity to reduce PGH_2 to $\text{PGF}_{2\alpha}$ in the presence of NADPH or NADH, and the activity is not absorbed by an antibody to the *Trypanosoma* PGF synthetic enzyme (TbPGFS). Since the *T. cruzi* $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthesizing protein has not been detected in other protozoan parasites, such as *Trypanosoma brucei* and *leishmania*,
25 or mammals including humans, it is thought to be peculiar to *Trypanosoma cruzi*.

- 3) The PGH₂-PGF_{2α} reductase purified from the *Trypanosoma cruzi* soluble fraction is a flavoprotein containing equimolar FMN.
- 4) cDNA of the protein has a protein translation region of 1,140 base pairs, and encodes a protein of molecular weight of 42,260 consisting of 379 amino acid residues.
- 5) From homology analysis based on the predicted amino acid sequence, this enzyme belongs to the old yellow enzyme (NADPH dehydrogenase) gene family, which is absent in animals. Thus, this enzyme was designated TcOYE.
- 6) The recombinant TcOYE produced and purified in large quantities through expression in *E. coli* using the cDNA exhibits a PGH₂-PGF_{2α} reductase activity with specific activity similar to that of the enzyme purified from the soluble fraction of *Trypanosoma cruzi*. Under anaerobic condition, the recombinant TcOYE catalyzes the reduction reaction of compounds lethal to *Trypanosoma*, such as hydrogen peroxide and butyl peroxide, as well as menadione, β-lapachone, nifurtimox, and 4-nitroquinoline-N-oxide.
- 7) TcOYE converts naphthoquinone compounds such as menadione and β-lapachone to semiquinone radicals by one-electron reduction. On the other hand, when the substrate is nifurtimox or 4-nitroquinoline-N-oxide, TcOYE conducts two-electron reduction and does not produce radicals.
- 8) Polyclonal antibodies to the TcOYE immunoprecipitate almost completely the activity of the PGH₂-PGF_{2α} reductase present in the soluble fraction of *Trypanosoma cruzi* and the

activity to reduce such compounds as menadione, β -lapachone, nifurtimox and 4-nitroquinoline-N-oxide.

Since TcOYE has not been found in other protozoan parasites, such as *Trypanosoma brucei* and *leishmania*, or mammals including humans, it may provide a good target for the development of trypanocidal drugs specific for *Trypanosoma cruzi*. In a screening of an enzymatic reaction using the recombinant TcOYE, the compounds that will undergo one-electron reduction to produce radicals are expected to have an antiparasitic effect against *Trypanosoma cruzi*, while the compounds that will undergo two-electron reduction are expected to be decomposed easily by *Trypanosoma cruzi*.

In addition, detection of the TcOYE protein and gene by an immunological method using antibodies to TcOYE and a molecular biological method using the nucleotide sequence of the TcOYE gene, such as the RT-PCR method, can be applied in developing a highly specific and simple method for diagnosing *Trypanosoma cruzi* infection.

(Solutions)

The present invention relates to the flavoprotein TcOYE derived from *Trypanosoma cruzi*, having the enzymatic activity to reduce prostaglandin H_2 to prostaglandin $F_{2\alpha}$.

In one aspect, the present invention relates to the recombinant protein of (a), (b) or (c) below:

(a) a protein containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2

(b) a protein comprising an amino acid sequence having deletion, substitution or addition of one or more amino acids in the amino acid sequence represented by SEQ ID No: 2, and having an enzymatic activity to reduce prostaglandin H₂ to

5 prostaglandin F_{2α}

(c) a protein comprising a fragment of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, and having an enzymatic activity to reduce prostaglandin H₂ to prostaglandin F_{2α}.

The present invention further relates to the gene encoding
10 the protein described above.

In one aspect, the present invention relates to the gene above consisting of the DNA containing the base sequence of SEQ ID NO: 1.

The present invention further relates to an antibody to
15 the protein described above.

The present invention further relates to a method of screening for trypanocidal drugs against *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

(i) preparing the protein described above and prostaglandin
20 H₂,

(ii) contacting the protein and prostaglandin H₂ with a candidate compound in the presence of NADPH or NADH, and

(iii) examining whether or not the reduction of prostaglandin H₂ to prostaglandin F_{2α} is inhibited.

25 In another aspect, the present invention further relates to a method of screening trypanocidal drugs against *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

- (i) incubating the protein described above with a candidate compound in the presence of NADPH or NADH, and
- (ii) determining whether or not the compound produces radicals as a result of one-electron reduction by the protein.

5 The present invention further relates to a method of diagnosing *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

- (i) incubating a specimen or the extract of a specimen with the antibody described above, and
- 10 (ii) examining whether or not an antigen/antibody complex forms.

 In another aspect, the present invention relates to a method of diagnosing *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

- 15 (i) reacting a specimen or the extract of a specimen with the gene described above or a fragment thereof, and
- (ii) examining whether or not they hybridize to each other.

 In another aspect, the present invention relates to a method of diagnosing *Trypanosoma cruzi* infection, comprising

20 the steps of:

- (i) preparing DNA collected from a specimen or cDNA synthesized from mRNA in a specimen using reverse transcriptase,
- (ii) performing PCR using this DNA or cDNA as a template, and using the nucleotide sequence contained in the cDNA of TcOYE
- 25 of SEQ ID NO: 1 as a sense primer and an antisense primer,
- (iii) examining whether or not the cDNA of TcOYE is amplified.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a graph showing production of prostaglandin by the crude extract of *Trypanosoma cruzi*;

Figure 2 is a view of a silica gel thin layer chromatograph
5 detecting [1-14c]-PGF_{2α} from the reduction of [1-14c]-PGH₂ in the presence of NADPH in the *Trypanosoma cruzi* soluble fraction;

Figure 3 is a view of an SDS polyacrylamide gel electrophoresis profile of the purified enzyme from
10 *Trypanosoma cruzi* showing a uniform band at molecular weight of 42,000;

Figure 4 is a table showing the yield and purification ratio by the purification steps of the prostaglandin H₂-F_{2α} reductase from *Trypanosoma cruzi*;

15 Figure 5 is an absorption spectrum in the visible region of the oxidation-state PGH₂-F_{2α} reductase purified from *Trypanosoma cruzi*;

Figure 6 is a schematic view showing expression of the recombinant TcOYE and an SDS polyacrylamide gel
20 electrophoresis profile of the specimen in different purification steps;

Figure 7 is a table showing the substrate specificity of reduction reaction by the recombinant TcOYE;

Figure 8 is a view showing electron spin resonance spectra
25 of semiquinone radicals produced through one-electron reduction of naphtoquinone compounds by TcOYE and superoxide

anion radicals produced through secondary reaction with oxygen;

Figure 9 is a graph showing inhibition of the PGH₂-F_{2α} reductase activity of TcOYE by naphtoquinone compounds and 5 nitro hetero-cycle compounds;

Figure 10 is a view of Western blot assay using a crude extract of *Trypanosoma* indicating the specificity of anti-TcOYE antibody;

Figure 11 is a schematic view of a silica gel thin layer 10 chromatograph showing immunoabsorption of the PGH₂-F_{2α} reductase activity in the *Trypanosoma cruzi* soluble fraction by an anti-TcOYE antibody; and

Figure 12 is a table showing immunoprecipitation by the anti-TcOYE antibody for the enzymatic activity to reduce 15 menadion, β-lapachone, nifurtimox, 4-nitroquinoline-N-oxide in the crude extract of *Trypanosoma cruzi*.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to the flavoprotein TcOYE 20 derived from *Trypanosoma cruzi*, having the enzymatic activity to reduce prostaglandin H₂ to prostaglandin F_{2α} in the presence of NADPH or NADH.

The present invention further relates to the recombinant protein of (a), (b) or (c) below:

25 (a) a protein containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2

(b) a protein (hereinafter sometimes referred to as "variant TcOYE") comprising an amino acid sequence having deletion, substitution or addition of one or more amino acids in the amino acid sequence represented by SEQ ID No: 2, and having
 5 an enzymatic activity to reduce prostaglandin H₂ to prostaglandin F_{2α}

(c) a protein (hereinafter sometimes referred to as "TcOYE fragment") containing a fragment of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, and having an enzymatic activity
 10 to reduce prostaglandin H₂ to prostaglandin F_{2α}.

This protein (TcOYE) has the following properties.

- (1) It contains equimolar flavin mononucleotide (FMN), and has a molecular weight of about 42,000.
- (2) It has an enzymatic activity to reduce PGH₂ to PGF_{2α} in
 15 the presence of NADPH or NADH.
- (3) It also reduces hydrogen peroxide, butyl peroxide, menadion, β-lapachone, 4-nitroquinoline-4-oxide, nifurtimox, phenazine methosulfate (5-methyl-phenazium methyl sulfate), mevinolin (2β,
 20 6α-dimethyl-8α-(2-methyl-1-oxo-butoxy)-mevinic acid lactone), 12-oxo-phytodienoic acid(4-oxo-5β-(2Z-pentenyl)-2-cyclopentene-1β-octanoic acid), 9-oxo-10E, 12Z-octadecadienoic acid, econazole(1-[2-([4-chlorophenyl]methoxy)-2-(2,4-dichlorop
 25 henyl)ethyl-1H-imidazole)].

(4) Reduction reactions include one-electron reduction where the substrate produces radicals and two-electron reduction where no radicals are formed.

(5) The enzymatic activity to reduce PGH_2 to $\text{PGF}_{2\alpha}$ is absorbed completely by the anti-TcOYE antibody.

(6) The enzymatic activity to reduce PGH_2 to $\text{PGF}_{2\alpha}$ is not absorbed by the anti-TbPGFS antibody.

The inventors succeeded in cloning the cDNA encoding the protein TcOYE from *Trypanosoma cruzi*. The cDNA has the base sequence of SEQ ID NO: 1. Therefore, TcOYE has the predicted amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

This protein (TcOYE) can be produced through isolation from *Trypanosoma cruzi*, but it is preferable to produce the protein using genetic recombination technology.

Procaryotes can be used for producing the protein of the present invention. Examples of procaryotes suitable for the production of the protein of the present invention include *Escherichia coli* K-12 294 and other *E. coli* strains, bacillus species such as *Bacillus subtilis*, intestinal bacteria such as *Salmonella typhimurium* and *Serratia marcescans*, various *Pseudomonas* species and *Streptomyces* species.

Examples of promoter sequences suitable for controlling gene expression in procaryotes include β -lactamase, lactose, alkaline phosphatase and tryptophan (*trp*) promoters. Hybrid promoters such as *tac* promoter may also be suitable. Generally, other bacterial promoters with known base sequences may be linked to the DNA encoding the protein of the present invention

by use of a linker or an adapter that provides any necessary restriction site.

The term "gene" as used herein refers to any molecule, such as DNA or RNA, having a nucleic acid sequence with the
5 sequence described above.

The present invention relates also to a vector, and especially a plasmid, cosmid, virus, bacteriophage and other conventional vectors used in genetic engineering that contains the nucleic acid of the present invention. Various plasmids
10 and vectors can be created using methods known to those skilled in the art. See for example, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. and Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989),
15 (1994). Plasmids and vectors preferably used according to the present invention include those known to those skilled in the art.

In a preferred embodiment, a nucleic acid molecule present in a vector is linked to the control sequence that can express
20 the gene in procaryotic or eucaryocytic cells.

The term "control sequence" refers to a regulatory DNA sequence necessary for the expression of the coding sequence to which it is linked. Properties of such control sequence vary depending on the host organism. In procaryotes, a control
25 sequence generally contains a promoter, a ribosome-binding site and a terminator. In eucaryotes, a control sequence generally contains a promoter, a terminator and in some cases

a transactivator or a transcription factor. The term "control sequence" implies that at least all components necessary for expression are contained, and other useful components may be contained.

5 The term "operably linked" implies a position that allows the component to operate in the intended manner. A control sequence "operably linked" to a coding sequence means that it is linked in a manner such that the expression of the coding sequence may be achieved under the condition compatible to
10 the control sequence. When the control sequence is a promoter, a double-stranded nucleic acid is preferably used, as is well known to those skilled in the art.

Therefore, preferably the vector according to the present invention is an expression vector. "Expression vector" is
15 a construct that can be used to transform a selected host cell and express a coding sequence in the selected host cell. For example, the expression vector can be a cloning, binary or integrating vector. Preferably the expression includes transcription of a nucleic acid molecule to a translatable
20 mRNA. Regulatory factors that ensure expression in procaryotic and/or eucaryotic cells are known to those skilled in the art. In the case of eucaryotes, such regulatory factors contain a promoter ensuring the initiation of transcription and, in some cases, a poly A signal ensuring the termination
25 of transcription and the stabilization of transcripts. Promoters generally used are a polyubiquitin promoter and an actin promoter. Other regulatory factors may include a

transcription enhancer. Possible regulatory factors enabling expression in procaryotic host cells include, for example, PL, lac, trp or tac promoters in *E. coli*. Examples of appropriate regulatory factors known to those skilled in the art which enable expression in eukaryotic host cells include AOX1 or GAL1 promoter in yeast, CMV- in mammalian and other animal cells, SV40-, RSV- (avian sarcoma virus) promoters, CMV enhancer, SV40 enhancer or the expression vector pcDV1 (Pharmacia) of Okayama-Berg which is globin intron, and the expression vectors pCDM8, pRc/CMV, pCDNA1, pCDNA3 (In-vitrogen) and pSPORT1 (GIBCO BRL). Another expression system which can be used to express the protein is an insect system. By one such system using *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) as a vector, a foreign gene is expressed in *Spodoptera frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae. The coding sequence of the gene of the present invention may be cloned into nonessential viral regions such as the polyhedrin gene, and placed under the control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of the coding sequence would inactivate the polyhedrin gene and produce a recombinant virus lacking in a coat protein. The recombinant virus is used to infect *Spodoptera frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae, in which the protein of the present invention is expressed (Smith, J. Virol. 46 (1983), 584; Engelhard, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91 (1994), 3224-3227). Advantageously, the vector of the present invention described above contains a selectable marker.

The present invention further relates to a host cell containing the vector described above or the gene of the invention wherein the nucleic acid sequence is exogenous to the host cell.

5 The term "exogenous" implies that a nucleic acid molecule is either heterologous to a host cell (meaning that it is derived from a cell or organism having a different genetic background) or homologous to a host cell but it has a different genetic background from the natural counterpart of the nucleic acid
10 molecule. This means that if the nucleic acid molecule is homologous to a host cell, it is not located at the natural site in the genome of the host cell and is surrounded, in particular, by different genes. In this case, the nucleic acid molecule may be under the control of the original promoter
15 or a heterologous promoter. The vector or gene of the present invention contained in a host cell may be incorporated into the genome of the host cell or maintained outside the chromosome within the cell. In this regard, the gene of the present invention may be used to recover or create a variant gene by
20 homologous recombination (ed. Paszkowski, Homologous Recombination and Gene Slicing in Plants, Kluwer Academic Publishers (1994)).

Thus, the present invention relates to a host cell containing the vector or gene of the present invention. The
25 host cell may be any procaryotic or eucaryotic cell including bacteria (archaebacteria), insects, fungi, plants and animals.

Preferably, the fungal cell is *Saccharomyces* species, and especially *Saccharomyces cerevisiae*.

The term "procaryotic" is used to include all bacteria that can be transformed or transfected with DNA or RNA for the expression of the protein of the present invention. Procaryotic hosts can include, for example, gram-positive and gram-negative bacteria such as *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* and *Bacillus subtilis*. The term "eukaryotic" is used to mean cells of yeast, higher plants, insects, and preferably mammals. The protein encoded by the polynucleotide of the present invention may or may not be glycosylated by the host used for the production of a recombinant. The protein of the present invention may or may not have the first amino acid residue methionine. Any technique generally known to those skilled in the art may be used to transform or transfect a host with the gene of the present invention. Furthermore, methods for fusion, preparation of a functionally bound gene, and expression thereof in, for example, in mammals and bacteria are known to those skilled in the art (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

The present invention further relates to the gene encoding the protein of (a), (b) or (c) below:

(a) flavoprotein TcOYE derived from *Trypanosoma cruzi*, having an enzymatic activity to reduce prostaglandin H_2 to prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the presence of NADPH or NADH.

(b) a protein containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2

(c) a protein comprising an amino acid sequence having deletion, substitution or addition of one or more amino acids in the amino acid sequence represented by SEQ ID No: 2, and having an enzymatic activity to reduce prostaglandin H₂ to prostaglandin F_{2α}

(d) a protein containing a fragment of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, and having an enzymatic activity to reduce prostaglandin H₂ to prostaglandin F_{2α}.

In one aspect, the gene encoding the protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 consists of the DNA containing the base sequence of SEQ ID NO: 1. There can be many base sequences depending on how the genetic code is degenerated.

The invention further relates to an antibody to:

(a) a protein containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2

(b) a protein (hereinafter sometimes referred to as "variant TcOYE") comprising an amino acid sequence having deletion, substitution or addition of one or more amino acids in the amino acid sequence represented by SEQ ID No: 2, and having an enzymatic activity to reduce prostaglandin H₂ to prostaglandin F_{2α}, or

(c) a protein containing a fragment of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, and having an enzymatic activity to reduce prostaglandin H₂ to prostaglandin F_{2α}.

These proteins can be used as a source of immunity to produce an antibody thereto. These antibodies can be polyclonal or monoclonal antibodies. The present invention also includes chimera, single chain and humanized antibodies as well as Fab fragments or the products of a Fab expression library. Various methods known in the art can be used for the production of such antibodies and fragments.

Antibodies generated against the protein corresponding to the sequence of the present invention can be obtained by injecting the protein directly into an animal or administering the protein to an animal, preferably non-human animal. The anti-TcOYE antibody obtained in such manner binds to TcOYE itself, and absorbs completely the PGH_2 - $\text{PGF}_{2\alpha}$ reductase activity. Using this method, even a sequence encoding a fragment of a protein can be used for producing an antibody binding to the complete natural protein.

Any technology providing an antibody produced by continuous cell culture can be used to prepare a monoclonal antibody. Examples of such technologies include hybridoma technology (Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497), trioma technology, human B cell hybridoma technology (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72) and EBV-hybridoma technology to produce human monoclonal antibody (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96).

The present invention relates to a method of screening trypanocidal drugs against *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

- (i) preparing the protein TcOYE and prostaglandin H₂,
- 5 (ii) incubating the protein and prostaglandin H₂ with a candidate compound in the presence of NADPH or NADH, and
- (iii) examining whether or not the reduction of prostaglandin H₂ to prostaglandin F_{2α} is inhibited.

An example of the reaction is as follows. For reaction
10 under aerobic condition, 1 μl of 500 μM [1-¹⁴C]PGH₂ solution (2.04 Gbq/mmol; acetone, DMSO or dimethylether diethylene glycol solution) is added to 100 μl of 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing a NADPH production system (100 μM NADP, 100 μM glucose-6-phosphate, 1 unit of glucose-6-phosphate
15 dehydrogenase), TcOYE and an inhibitor, and is allowed to react at 37°C for two minutes. For reaction under anaerobic condition, after bubbling the reaction mixture with argon gas for five minutes, 100 μM NADPH or NADH and 1 μl PGH₂ solution are added, and the mixture is allowed to react in argon gas
20 at 37°C for two minutes.

250 μl of a stop solution (diethyl ether:methanol:2M citric acid (30:4:1 mixed solution)) at -20°C and an excess amount of anhydrous sodium sulfate are added to stop the reaction, and the remaining substrate ([1-¹⁴C]PGH₂) and the
25 enzymatic reaction product ([1-¹⁴C]PGF_{2α}) are extracted in ether at the same time. Part (about 50 μl) of the ether layer is applied onto a silica gel thin layer (Merck & Co.) in a

low-temperature room, and thin-layer chromatography (eluent: diethyl ether: methanol: acetic acid (90:2:1 mixed solution)) is performed in a refrigerated room at -20°C. After development, autoradiography of the thin layer plate is performed using the image analyzer FL2000 (Fuji Photo Film), and the substrate to product ratio is calculated to determine enzymatic activity.

When non-labeled PGH2 is used, the substrate and a product after reaction are determined by separation using LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry; Waters Alliance LC-MS system, 2690 separation module, 996 photodiode array detector, ZQ4000 mass detector; Inertsil-ODS3 column), and the substrate to product ratio is calculated similarly to determine enzymatic activity.

The enzymatic reaction described above is conducted in the presence or absence of an inhibitor and a decrease in the reaction rate due to the inhibitor is examined to determine whether or not the reduction is inhibited. Because it is very likely that *Trypanosoma cruzi* uses prostaglandin to sustain parasitism in host cells, an inhibitor of TcOYE may be used to inhibit *Trypanosoma cruzi* parasitism in host cells.

The present invention further relates to a method of screening trypanocidal drugs against *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

(i) incubating the protein TcOYE with a candidate compound in the presence of NADPH or NADH, and

(ii) determining whether or not the compound produces radicals as a result of one-electron reduction by the protein.

One milliliter of 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing TcOYE and a substrate candidate is bubbled with argon gas for five minutes to make an anaerobic environment. Then, 100 μ M NADPH or NADH is added to the reaction mixture and allowed to react at 37°C under anaerobic condition, and the decrease in NADPH or NADH is followed by determining absorbance at 340 nm.

Generation of radicals as a result of one-electron reduction is determined as follows. A hundred microliter of 5 mM tris-HCl buffer (pH 7.0) containing TcOYE and a substrate candidate is displaced with argon gas for 5 minutes to make an anaerobic environment. Then, 10 mM NADPH or NADH is added to the reaction mixture and allowed to react at 25°C or 37°C for 3 minutes under anaerobic condition. Part of the reaction mixture is analyzed with an electron spin resonance spectrometer (JEOL X-band spectrometer) to determine the generation of radicals. The measurement conditions and analytical method are described in the paper below. It is believed that the radicals produced react with oxygen to generate superoxide anion radicals (Moreno S.N.J. et al., J.Biol. Chem. 259: 6298-6305, 1984), which kill *Trypanosoma cruzi*.

The present invention further relates to a method of diagnosing *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

- (i) incubating a specimen or the extract of a specimen with the anti-TcOYE antibody described above, and
- (ii) examining whether or not an antigen/antibody complex forms.

5 Examples of specimens used for diagnosis include blood samples from suspected patients with *Trypanosoma cruzi* infection, biopsies such as muscular tissues, and body fluids such as cerebrospinal fluid. The term "extract of a specimen" refers to protein, DNA or RNA which is extracted from the
10 specimen described above.

 The specimen described above is allowed to react with hypotonic buffer solution to extract TcOYE from infecting *Trypanosoma cruzi*. The extract is allowed to react with an anti-TcOYE antibody to determine whether or not an
15 antigen/antibody complex forms.

 In addition, tissue sections and smears may be allowed to react with an anti-TcOYE antibody, then with a suitable fluorescent material or an enzyme-labeled secondary antibody to visualize localization of *Trypanosoma cruzi*.

20 Ordinary western blotting, the ELISA method using an immobilized antibody or the latex coagulating method can be used for the detection of an antigen-antibody complex. The immunohistochemical stain method commonly used (enzyme antibody stain and fluorescent antibody stain) can be used
25 for detection in tissue sections and smear samples.

The present invention further relates to a method of diagnosing *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

- (i) incubating a specimen or the extract of a specimen with the gene encoding TcOYE or a fragment thereof, and
- (ii) examining whether or not they hybridize to each other.

The DNA extracted from the specimen described above is digested with various restriction enzymes, and DNA fragments are separated by agarose gel electrophoresis and transcribed onto a nylon film. The transcribed film is allowed to react with a cDNA or RNA probe of TcOYE labeled with a radioisotope or digoxigenin to determine the presence of a gene binding the probe (southern blotting). Alternatively, RNA extracted from the specimen described above may be used to determine the presence of the mRNA of TcOYE in a similar manner (northern blotting).

For the detection of the TcOYE gene or mRNA in tissue sections and smears, the in situ hybridization method may be used with a cDNA or RNA probe of TcOYE which is labeled with a radioisotope or digoxigenin.

The present invention further relates to a method of diagnosing *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

- (i) preparing DNA collected from a specimen or cDNA synthesized from the mRNA in a specimen using reverse transcriptase,

(ii) performing PCR using this DNA as template, and using the nucleotide sequence contained in the cDNA of TcOYE of SEQ ID NO: 1 as a sense primer and an antisense primer, and
(iii) examining whether or not the cDNA of TcOYE is amplified.

5 For example, a sense primer (for example,
5'-ATGGCGACGTTCCCTGAACTCC-3') (SEQ ID NO: 8) and an antisense
primer (for example, 5'-TTATTTGTTGTACGTCGGGTA-3') (SEQ ID NO:
9) contained in cDNA of TcOYE may be used for polymerase chain
reaction (PCR) using the DNA from a small amount of body fluids
10 infected with *Trypanosoma cruzi*, such as whole blood, muscular
tissue and cerebrospinal fluid, as template to determine
whether or not the cDNA of TcOYE is amplified. The PCR method
includes, for example, a cycle of 95°C for 5 minutes for DNA
denaturation, and 30 cycles for amplification each consisting
15 of 95°C for 1 minute for DNA denaturation, 56°C for 30 seconds
for primer binding and 72°C for 1 minute for elongation by
DNA polymerase.

The following examples further illustrate the present
invention, but are not intended to limit the scope of the
20 invention.

Examples

Example 1

Prostaglandin synthesizing system in *Trypanosoma cruzi*

The vegetative form (epimastigote) of *Trypanosoma cruzi*
25 YNIH strain in the insect body (obtained from the National
Institute of Infectious Diseases (1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku,
Tokyo)) was incubated by the conventional method (Nozaki T.

et al., J. Biol. Chem. 276: 6516-6523, 2001) using synthetic culture medium. The cultured protozoa was destroyed by hyposmotic treatment and allowed to react with arachidonic acid, and the PGs produced were extracted with an organic solvent and separated/purified by HPLC. Determination using a commercial kit (Kubata B. X. et al., J. Exp. Med. 188: 1197-1202, 1998) showed that the crude extract of *Trypanosoma cruzi* produced PGD₂, PGE₂ and PGF_{2α} actively (see Figure 1). Production of these PGs was completely prevented by heat treatment at 100°C for 20 minutes, but was unaffected by 3 μM Aspirin or 42 μM indomethacin, which completely inhibit PG production in mammals.

Example 2

Prostaglandin H₂-F_{2α} reductase activity in *Trypanosoma cruzi*

40 μM [1-14C]-PGH₂ is allowed to react with 500 μM NADPH in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) undergoing argon gas bubbling at 37°C for 2 minutes under anaerobic condition. If the soluble fraction of *Trypanosoma cruzi* is added, almost all PGH₂ is converted into PGF_{2α} (see Figure 2). However, this conversion will not take place unless the heat-denatured soluble fraction of *Trypanosoma cruzi* or NADPH is added.

Example 3

Purification of the prostaglandin H₂-F_{2α} reductase from *Trypanosoma cruzi* and amino acid sequencing thereof

The soluble fraction of *Trypanosoma cruzi* was subjected to ammonium sulfate fractionation and the 20 to 80% ammonium sulfate saturation fractions were collected. These fractions

were fractionated by gel filtration column chromatography (Hiload 16/60 Superdex 200 pg column, Amersham Pharmacia Biotec). The active fraction was concentrated with a Centricon concentrator (Millipore) with a cut-off value of 3,000 molecular weight, dialyzed in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0), adsorbed by reversed phase column chromatography (Resource PHE reversed phase column, Amersham Pharmacia Biotec) equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 2 mol ammonium sulfate, and eluted with reverse-gradient ammonium sulfate, ranging from 2 mol to 0 mol, containing 0.1% Tween20. The active fraction was dialyzed in 20 mM Tris-HCL buffer (pH 8.0), adsorbed to an ion exchange resin column (Hiload 16/60 DEAE ion-exchange column, Amersham Pharmacia Biotec) equilibrated with this buffer and eluted in a linear concentration gradient of NaCl ranging from 0 to 400 mM. Gel filtration column chromatography (Hiload 16/60 Superdex 200 pg column, Amersham Pharmacia Biotec) of the active fraction resulted in a purified enzyme displaying a uniform band at molecular weight of 42,000 on SDS polyacrylamide gel electrophoresis, with a specific activity of about 700 nmol/min/mg protein and a yield in terms of PGH₂-F_{2α} reductase activity of about 1% with an about 1630-fold purification ratio (see Figures 3 and 4).

Purified PGH₂-PGF_{2α} reductase binds a yellow pigment: Its absorption spectrum in the visible range has an absorption maximum near 379 nm and 462 nm when in oxidation state. The visible absorption spectrum disappears when 100 μM NADPH is

added to reduce the enzyme. Thus, the enzyme is a flavoprotein that binds one molecule of flavin mononucleotide (FMN) per molecule of the enzyme (see Figure 5).

When the purified enzyme was treated with lysyl
5 endopeptidase (Rosenfeld, J. et al., Anal. Biochem., 203:
173-179, 1992) and separated by reversed phase chromatography,
three peptides were collected, whose amino acid sequences were
determined as below.

Peptide 1: AsnArgIleIleMetAlaProLeuThrArg (SEQ ID NO:
10 3)

Peptide 2: AspHisArgIleProValTyrPheAlaAla (SEQ ID NO:
4)

Peptide 3: IleSerAsnLeuArgTyrAspPheGluGlu (SEQ ID NO:
5)

15 Example 4

Expression of a recombinant protein using cDNA cloning of TcOYE and *E. coli*

Search of the EMBL/GenBank/DDBJ Database for the amino
acid sequences of the three peptides obtained revealed two
20 of the three peptides, and the remaining peptide with one
different amino acid residue, in the predicted protein
translation region of the 1,686 bp gene designated U31282
(Catmull, J. and Donelson, J. E., EMBL/GenBank/DDBJ Database,
1995, a homologous gene of the yeast old yellow enzyme gene
25 found with the cytozoic type of *Trypanosoma cruzi*, described
as a *Trypanosoma cruzi* reductase).

The base sequence below was synthesized from the nucleotide sequence of the protein translation region of *Trypanosoma cruzi* reductase as a sense primer to which an EcoRI restriction enzyme sequence was added at the 5' end,

5 5'-CGGAATTCATGGCGACGTTCCCTGAACTTC-3' (SEQ ID NO: 6)

and the base sequence below as an antisense primer to which an XhoI restriction enzyme sequence was added at the 5' end,

5'-CCGCTCGAGTTATTTGTTGTACGTCGGGTA-3' (SEQ ID NO: 7).

Total RNA was extracted from the vegetative form of
10 *Trypanosoma cruzi* in an insect body using the Guanidine hydrochloride-phenol method (ISOGEN solution, Nippon Gene) and annealed to an oligo dT-adapter primer (Takara Shuzo Co., Ltd.) to synthesize single-strand cDNA using avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Takara Shuzo Co.,
15 Ltd.). PCR using the synthetic sense and antisense primers described above resulted in amplification of the cDNA containing a protein translation region of a molecular weight of 42,260 comprising 379 amino acid residues (SEQ ID Nos. 1 and 2). The nucleotide sequence of the cDNA obtained differed
20 from U31282 at 6 sites, one of which was accompanied by variation in amino acid residues. The entire amino acid sequences of the three peptides determined with the purified enzyme were contained in the protein translation region of the cDNA obtained.

25 The cDNA obtained was inserted into the EcoRI/XhoI site of the pGEX-4T-1 vector (Amersham Pharmacia Biotech) to produce a protein expression vector.

When *E. coli* BL21 was transformed with this vector and incubated for 7 hours in the presence of 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactosylpyranoside, the recombinant TcOYE was expressed in the *E. coli* soluble fraction as a fusion protein with glutathione transferase. The *E. coli* cells were destroyed ultrasonically and the extract was subjected to a glutathione affinity column (glutathione Sepharose 4B, Amersham Pharmacia Biotech) to adsorb the fusion protein to resin, and, after washing, the column was treated with thrombin to recover the recombinant TcOYE. Thus, highly purified recombinant TcOYE was produced easily in large quantities (see Figure 6).

Example 5

Substrate specificity of the reduction reaction by the recombinant TcOYE

The PGH₂-F_{2 α} reductase activity of the purified recombinant TcOYE was 766 nmol/minute/mg protein, a value representing a specific activity almost similar to the specimen purified from the soluble fraction of *Trypanosoma cruzi*.

The recombinant TcOYE was allowed to react with 500 μ M NADPH or NADH in argon-bubbled 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) and the decrease in absorption at 340 nm was measured to determine substrate specificity for various compounds; results showed that TcOYE reduced hydrogen peroxide and butyl peroxide (see Figure 7). TcOYE also reduces anti-*Trypanosomal* quinones and nitro compounds, such as menadion, β -lapachone, 4-nitroquinoline-4-oxide, nifurtimox,

phenazine methosulfate (5-methyl-phenaziummethylsulfate),
 mevinolin (2 β ,
 6 α -dimethyl-8 α -(2-methyl-1-oxo-butoxy)-mevinic acid
 lactone), 12-oxo-phytodienoic acid

- 5 (4-oxo-5 β -(2Z-pentenyl)-2-cyclopentene-1 β -octanoic acid),
 9-oxo-10E, 12Z-octadecadienoic acid, and econazole
 (1-[2-([4-chlorophenyl]methoxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)eth
 yl-1H-imidazole)]. However, it did not reduce benznidazole
 or crystal violet
- 10 (N-[4[bis[4-(dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-yl-methyl)-1,
 3-dioxolane-4-yl-methoxy]phenyl]piperazine]) (see Figure
 7).

The electron spin resonance spectrum of the reaction
 product of TcOYE was measured with a JEOL X-band spectrometer
 15 (JEOL Ltd.) (Moreno, S. N. J. et al., J. Biol. Chem. 259:
 6298-6305, 1984); a signal was detected that showed that
 naphtoquinone compounds such as menadion and β -lapachone
 underwent one-electron reduction and produced semiquinone
 radicals. The semiquinone radicals reacted with oxygen and
 20 produced superoxide anion radicals, which kill the protozoa
 (see Figure 8). On the other hand, nitro heterocyclic
 compounds, such as nifurtimox, 4-nitroquinoline-N-oxide or
 mevinolin, underwent two-electron reduction and did not
 produce radicals.

- 25 Naphtoquinone compounds and nitro heterocyclic compounds
 that are reduced by TcOYE inhibit the PGH₂-F_{2 α} reducing activity
 of TcOYE in a dose-dependent manner. Nifurtimox inhibits the

activity most strongly and the inhibiting effect of menadion, β -lapachone and 4-nitroquinoline-N-oxide is weak (see Figure 9).

Example 6

5 Production of anti-TcOYE antibody

Antigen of the recombinant TcOYE (300 μ g) dissolved in 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) was mixed with an equal quantity of Freund complete adjuvant (Difco) and emulsified. The antigen emulsion was administered to a female Japanese white
10 rabbit Kbl at 20 subcutaneous sites in the shoulder for immunization. Then, every two weeks, an equal dose of the antigen emulsified by adding an equal quantity of incomplete Freund's adjuvant was administered a total of four times. Four weeks following the second immunization, blood was sampled
15 from the rabbit's ear vein. The blood sample was allowed to set overnight at 4°C and the serum was collected by centrifugal separation (1000 X g, for 20 minutes). The blood serum was separated by protein A sepharose chromatography (Amersham Pharmacia Biotech), and the IgG fraction was purified.

20 Example 7

Anti-TcOYE antibody and immunoabsorption test of drug metabolizing activity using the same

The antibody obtained by immunizing the rabbit with the purified recombinant TcOYE displayed immunological
25 cross-reaction with only TcOYE in the Western blot assay using the crude extract of *Trypanosoma cruzi*. No protein was detected in the crude extract of *Trypanosoma bruci* or

leishmania that exhibited immunological cross-reaction or bound TbPGFS. On the contrary, the antibody obtained by immunizing a rabbit with the recombinant TbPGFS did not recognize TcOYE, and no protein displaying immunological cross-reaction was detected in the crude extract of *Trypanosoma cruzi* (see Figure 10).

In an immunoabsorption test using the crude extract of *Trypanosoma cruzi*, the anti-TcOYE antibody absorbed the PGH₂-F₂ α reductase activity almost completely, but the anti-TbPGFS antibody had no effect on the activity (see Figure 11). The anti-TcOYE antibody almost completely immunoprecipitated the enzymatic activity to reduce menadion, β -lapachone, nifurtimox, 4-nitroquinoline-N-oxide in the crude extract of *Trypanosoma cruzi* (see Figure 12).

These results show that the activity of the PGH₂-PGF_{2 α} reductase and the activity to reduce such compounds as menadione, β -lapachone, nifurtimox and 4-nitroquinoline-N-oxide in the crude extract of *Trypanosoma cruzi* are mediated by TcOYE for the most part.

CLAIMS

1. Aflavoprotein (TcOYE) derived from *Trypanosoma cruzi*,
having an enzymatic activity to reduce prostaglandin H₂ to
5 prostaglandin F_{2α}.
2. A recombinant protein of (a), (b) or (c) below:
 - (a) a protein comprising the amino acid sequence
represented by SEQ ID NO: 2
 - (b) a protein (hereinafter sometimes referred to as
10 "variant TcOYE") comprising an amino acid sequence having
deletion, substitution or addition of one or more amino acids
in the amino acid sequence represented by SEQ ID No: 2, and
having an enzymatic activity to reduce prostaglandin H₂ to
prostaglandin F_{2α}, and
 - 15 (c) a protein comprising a fragment of the amino acid
sequence represented by SEQ ID NO: 2, and having an enzymatic
activity to reduce prostaglandin H₂ to prostaglandin F_{2α}.
3. A gene encoding the protein according to claim 1 or
2.
- 20 4. The gene according to claim 3 comprising DNA
comprising the base sequence of SEQ ID NO: 1.
5. An antibody to the protein according to claim 1 or
2.
6. A method of screening trypanocidal drugs for
25 *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:
 - (i) preparing the protein according to claim 1 or 2 and
prostaglandin H₂,

(ii) incubating the protein and prostaglandin H_2 with a candidate compound in the presence of NADPH or NADH, and

(iii) examining whether or not reduction of prostaglandin H_2 to prostaglandin $F_{2\alpha}$ is inhibited.

5 7. A method of screening trypanocidal drugs for *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

(i) incubating the protein according to claim 1 or 2 with a candidate compound in the presence of NADPH or NADH, and

(ii) determining whether or not the compound produces
10 radicals as a result of one-electron reduction by the protein.

8. A method of diagnosing *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

(i) incubating a specimen or the extract of a specimen with the antibody according to claim 5, and

15 (ii) examining whether or not an antigen/antibody complex forms.

9. A method of diagnosing *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

(i) incubating a specimen or the extract of a specimen
20 with the gene according to claim 3 or a fragment thereof, and

(ii) examining whether or not the specimen or the extract of the specimen hybridizes with the gene or a fragment thereof.

10. A method of diagnosing *Trypanosoma cruzi* infection, comprising the steps of:

25 (i) preparing DNA collected from a specimen or cDNA by synthesis from mRNA in a specimen using reverse transcriptase,

(ii) performing PCR using said DNA or said cDNA as a template, and using the nucleotide sequence contained in the cDNA of TcOYE of SEQ ID NO: 1 as a sense primer and an antisense primer, and

5 (iii) examining whether or not the cDNA of TcOYE is amplified.

ABSTRACT

It is intended to provide a method of diagnosing infection with Chagas disease by screening a trypanocidal drugs for
5 *Trypanosoma cruzi* which is the pathogen of Chagas disease. Using a flavin protein TcOYE specific to *Trypanosoma cruzi*, a trypanocidal drugs effective against *Trypanosoma cruzi* is screened. Using the gene sequence of TcOYE and an antibody therefor, infection with *Trypanosoma cruzi* is diagnosed.

1/12

Fig. 1

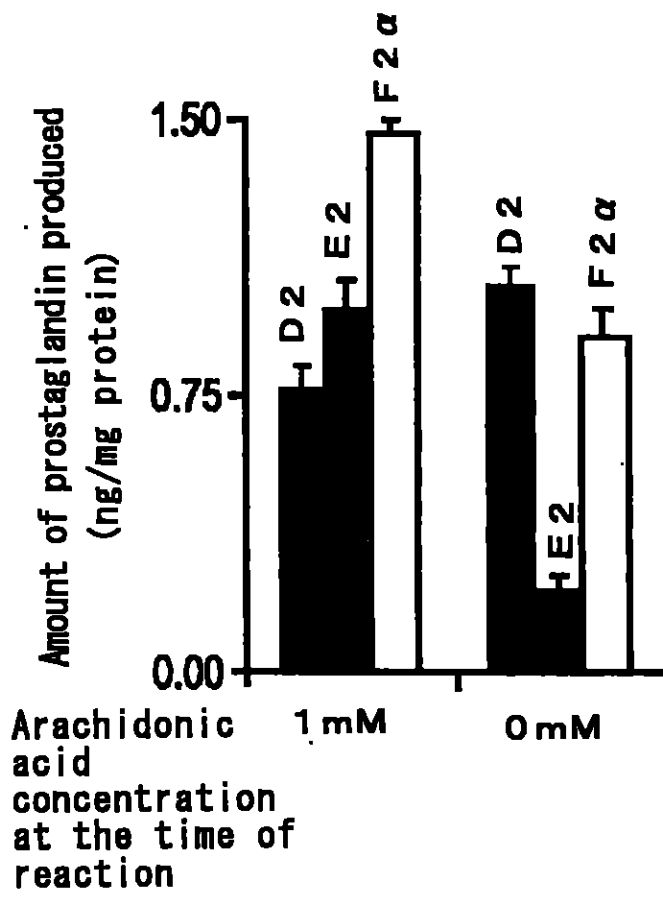
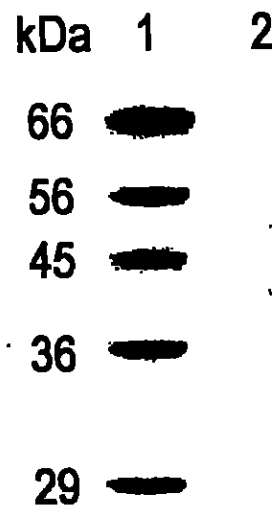


Fig. 3



- 1. Molecular-weight marker protein
- 2. Purified enzyme

Purification step	Total protein (mg)	Enzymatic activity (nmol/min)	Specific activity (nmol/min/mg protein)	Purification ratio
Soluble fraction	1 7 1.0	1 5 4	0.9	1.0
20-80% saturation ammonium sulfate fraction	1 2 7.0	1 5 0	1.2	1.3
Superdex 200	1 1 3.0	1 5 0	1.2	1.3
Ultrafiltration chromatogram	8.0	1 7 0	2 5.0	2 8.0
Hydrophobic chromatogram				
DEAE ion exchange chromatogram	2.8	1 8 0	6 4.0	7 1.0
Superdex 200	0.3	2 1 0	7 0 0.0	7 7 8.0
Ultrafiltration chromatogram				
2nd time				

Fig. 4

5/12

Fig. 5

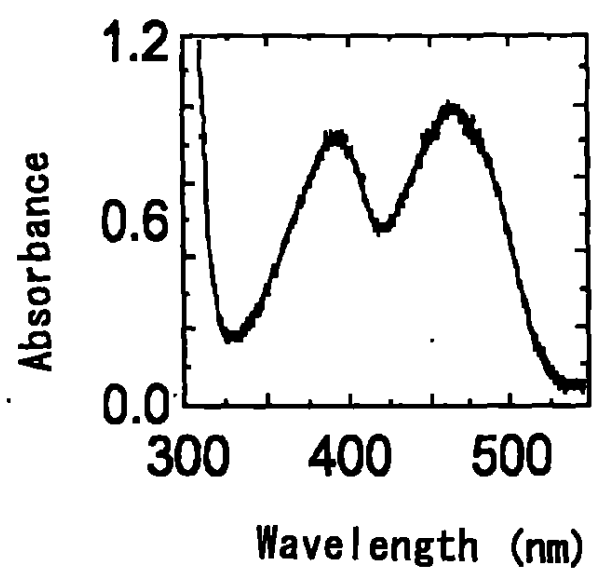
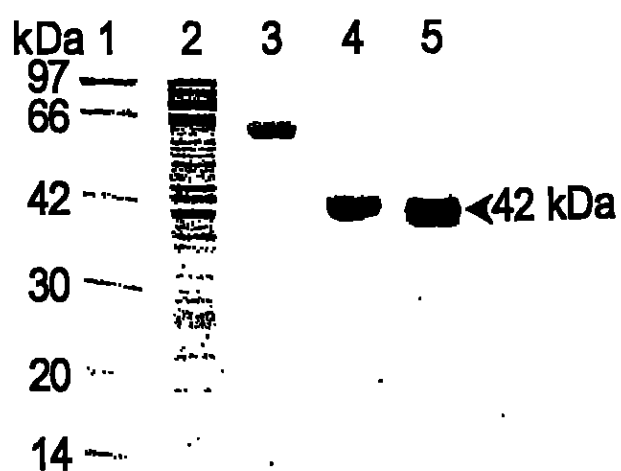


Fig. 6



1. Molecular weight marker protein
2. E. coli crude extract after transformation
3. Crude extract of E. coli expressing the recombinant TcOYE
4. Recombinant TcOYE collected by thrombin treatment
5. Purified standard of the recombinant TcOYE

7/12

Fig. 7

Substrate specificity of reduction by the recombinant TcOYE

Substrate	Cofactor (10 μ M)	K _m (μ M)	V _{max} /specific activity (nmol/min/mg)
9,11-endoperoxide PGH ₂	NADH	—	554
	NADPH	5.0	766
Hydrogen peroxide BHP ^a	NADPH	2.3	99
	NADPH	n. d.	282
Menadione	NADH	—	499
	NADPH	0.82	700
β -lapachone	NADH	0.17	650
	NADPH	—	433
4-nitroquinolin-N-oxide	NADH	—	759
	NADPH	9.5	1110
Nifurtimox	NADH	—	290
	NADPH	19.0	353
Phenazine methosulfate ^b Mevinolin ^c	NADPH	10.4	235
	NADH	n. d.	555
12-oxo-phytodienoic acid ^d	NADPH	n. d.	152
9-oxo ODE ^e	NADPH	n. d.	54
Econazole ^f	NADH	n. d.	43
Benznidazole	—	n. d.	N. D.
Miconazole ^g	—	n. d.	N. D.
Ketoconazole ^h	—	n. d.	N. D.
Crystal violet ⁱ	—	n. d.	N. D.
BHT ^j	—	n. d.	N. D.
BHA ^k	—	n. d.	N. D.

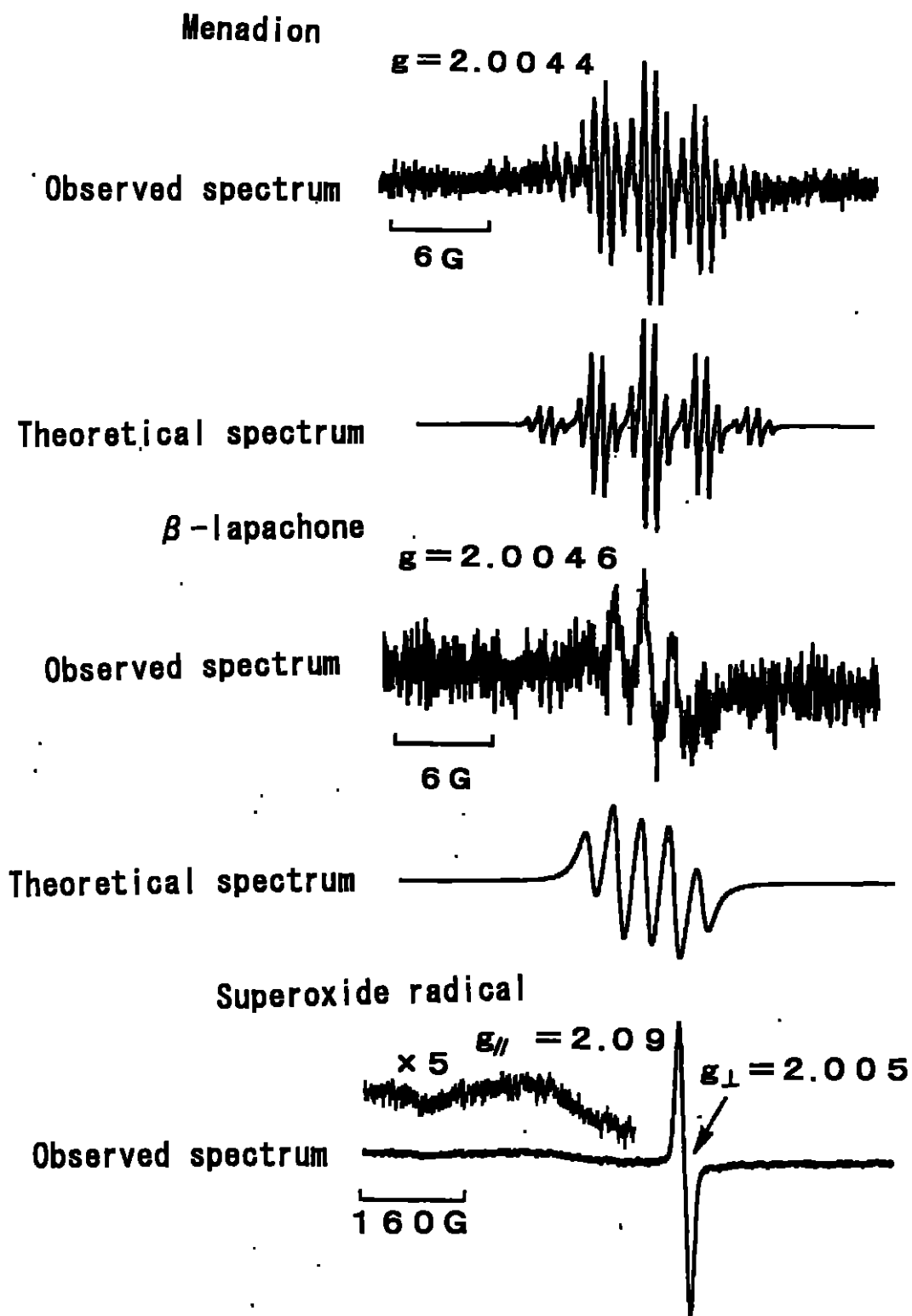
a: t-butyl hydroperoxide, b: 5-methyl-phenaziummethylsulfate), c: 2- β , 6 α -dimethyl-8 α -(2-methyl-1-oxo-butoxy)-mevinic acid lactone), d: 4-oxo-5 β -(2Z-pentenyl)-2-cyclopentene-1 β -octanoic acid), e: 9-oxo-10E, 12Z-octadecadienoic acid, f: 1-[2-([4-chlorophenyl] methoxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl-1H-imidazole], g: 1-[2,4-dichloro β -([2,4-dichlorobenzyl]-oxo)phenethyl] imidazole, h: cis-1-acetyl-4[4-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl-methyl)-1,3-dioxolane-4-yl-methoxy]phenyl]piperazine], i: N-[4-[bis[4-(dimethylamino)-phenyl]methylene]-2,5-cyclohexadiene-1-yl-iden-N-methyl-methane aluminum chloride, j: (2,6di-tert-butyl-para-cresol), k: [2(3)-tert butyl-4-hydroxyanisole

N. D. : not detected

n. d. : not measured

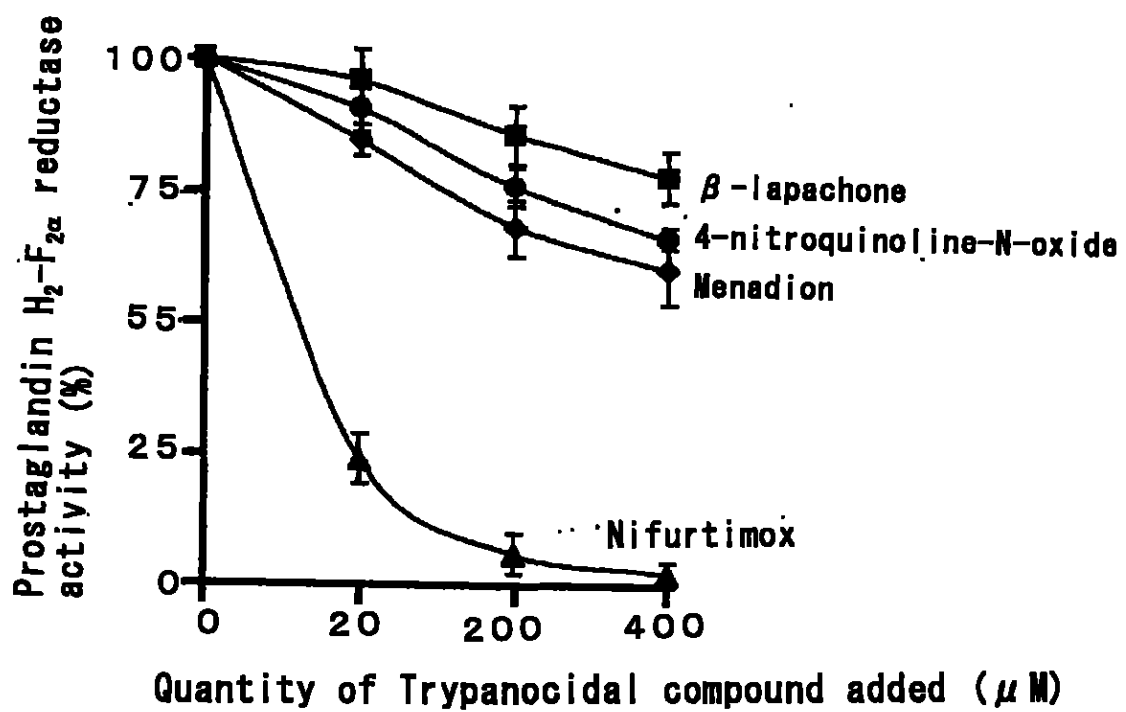
8/12

Fig. 8



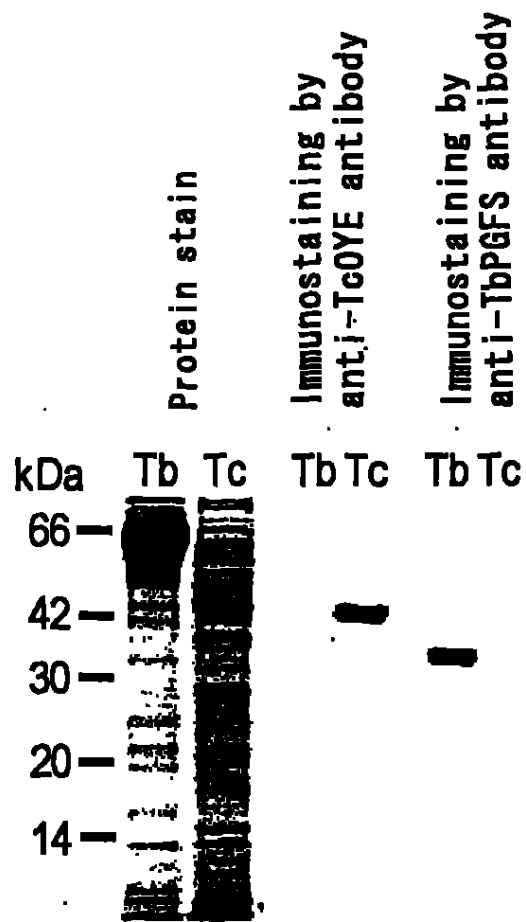
9/12

Fig. 9



10/12

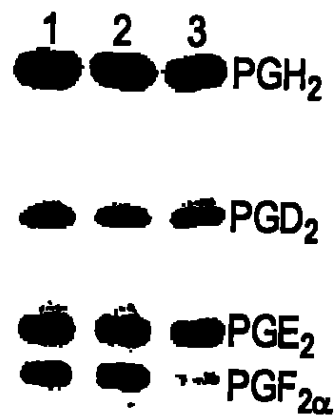
Fig. 10



Tb: Crude extract of Trypanosoma brucei
Tc: Crude extract of Trypanosoma cruzi

11/12

Fig. 11



1. Trypanosoma cruzi crude extract after reaction with control IgG
2. Trypanosoma cruzi crude extract after reaction with anti-TbPGFS antibody
3. Trypanosoma cruzi crude extract after reaction with anti-TcOYE antibody

Immunoprecipitation by the anti-TcOYE antibody of
the enzymatic activity to reduce menadion, β -lapachone, nifurtimox,
4-nitroquinoline-N-oxide in the crude extract
of *Trypanosoma cruzi*

Fig. 12

Sample	Persistent enzymatic activity (%)			4-nitroquinolone- N-oxide
	Menadion	β -lapachone	Nifurtimox	
<i>Trypanosoma cruzi</i> extract after reaction with anti- TcOYE antibody	*N. D.	10($\pm$ 2)	N. D.	N. D.
<i>Trypanosoma cruzi</i> extract after reaction with anti- TbPGFS antibody	98($\pm$ 8)	103($\pm$ 3)	100($\pm$ 5)	100($\pm$ 10)
<i>Trypanosoma cruzi</i> extract after reaction with control bovine IgG	100($\pm$ 4)	100($\pm$ 6)	100($\pm$ 10)	100($\pm$ 6)

12/12

27

SEQUENCE LISTING

<110> Osaka Bioscience Institute

<110> JAPAN AS REPRESENTED BY THE DIRECTOR-GENERAL OF
NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES

<120> FLAVOPROTEIN FROM TRYPANOSOMA CRUZI, METHOD FOR SCREENING
EXTERMINATING AGENT FOR IT AND METHOD FOR DIAGNOSING INFECTION
THEREOF

<130> 664102

<150> JP 2002-299284

<151> 2002-10-11

<160> 9

<210> 1

<211> 1140

<212> DNA

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 1

atggcgacgt tccctgaact tctgcggccc ctcaaattgg ggcgctacac acttcgtaant 60
cggattatta tggctccctt gacgcgttgc caggcaacag aagatgatca tgtaccaagg 120
acggaatcga tgctgaagta ctacgaagac cgggcatctg caggtcttat cattgccgag 180
gcgacgatgg tccagccaaa ctacactggg ttcttcacgg agcctggcat ttactccgat 240
gcgcagattg aggagtggag aaagatcgtg gacgcgttac acaaaaaggg tggccttata 300
ttcttgcaac tcattcacgc tggtcgagcc gggattccgg agaagatcct tcagcagtcg 360

2/6

aagagtgacc aggatcccct tgctgggagc ctgcttgccg cgagtgccat tcccattaag 420
gaccatcgga ttcctgccta ttttgctgcg agcggagaaa aggagacctt cgggtgtcca 480
gaggagctca cggatgacga agtccgggac ggtatcatcc cattgtttgt ggagggggcc 540
aaaaacgcca tctttaaggc tgggtttgat ggcgttgaga ttcattggagc caacggctac 600
ttactggacg ccttttttcg cgaatcttcc aacaagcgcc agtccgggtc gtacgccgga 660
acgaccatcg acacacgatg ccaactcatc tacgatgtca ccaaaagcgt ctgcgatgcc 720
gtgggaagtg accgtgtggg gctccgcata tccccactaa acggcgtgca tgggatgatt 780
gactcgaacc cggaggcact aaccaagcat ctatgcaaga aaattgagcc actttcgctt 840
gcctatctgc attacttgcg tggcgacatg gtcaaccagc agattggtga cgttgtggcg 900
tgggttcgtg gaagttacag cgggtgtaaaa atatccaact tgcgctacga tttcgaagag 960
gcagaccagc aaatacggga aggaaaagtc gacgccgtgg cttttggcgc caagttcatt 1020
gcgaaccccg atctcgttga aagggcccaa caaaactggc cctcaacga gccgcgacca 1080
gaaacatact acacaagaac agcagtcgga tacaacgatt acccgacgta caacaaataa 1140

<210> 2

<211> 379

<212> PRT

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 2

Met Ala Thr Phe Pro Glu Leu Leu Arg Pro Leu Lys Leu Gly Arg Tyr

1 5 10 15

Thr Leu Arg Asn Arg Ile Ile Met Ala Pro Leu Thr Arg Cys Gln Ala

20 25 30

Thr Glu Asp Asp His Val Pro Arg Thr Glu Ser Met Leu Lys Tyr Tyr

35 40 45

Glu Asp Arg Ala Ser Ala Gly Leu Ile Ile Ala Glu Ala Thr Met Val

50 55 60

Gln Pro Asn Tyr Thr Gly Phe Leu Thr Glu Pro Gly Ile Tyr Ser Asp

65 70 75 80

3/6

Ala Gln Ile Glu Glu Trp Arg Lys Ile Val Asp Ala Val His Lys Lys			
85	90	95	
Gly Gly Leu Ile Phe Leu Gln Leu Ile His Ala Gly Arg Ala Gly Ile			
100	105	110	
Pro Glu Lys Ile Leu Gln Gln Ser Lys Ser Asp Gln Asp Pro Leu Ala			
115	120	125	
Gly Arg Leu Leu Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ile Lys Asp His Arg Ile			
130	135	140	
Pro Ala Tyr Phe Ala Ala Ser Gly Glu Lys Glu Thr Tyr Gly Val Pro			
145	150	155	160
Glu Glu Leu Thr Asp Asp Glu Val Arg Asp Gly Ile Ile Pro Leu Phe			
165	170	175	
Val Glu Gly Ala Lys Asn Ala Ile Phe Lys Ala Gly Phe Asp Gly Val			
180	185	190	
Glu Ile His Gly Ala Asn Gly Tyr Leu Leu Asp Ala Phe Phe Arg Glu			
195	200	205	
Ser Ser Asn Lys Arg Gln Ser Gly Pro Tyr Ala Gly Thr Thr Ile Asp			
210	215	220	
Thr Arg Cys Gln Leu Ile Tyr Asp Val Thr Lys Ser Val Cys Asp Ala			
225	230	235	240
Val Gly Ser Asp Arg Val Gly Leu Arg Ile Ser Pro Leu Asn Gly Val			
245	250	255	
His Gly Met Ile Asp Ser Asn Pro Glu Ala Leu Thr Lys His Leu Cys			
260	265	270	
Lys Lys Ile Glu Pro Leu Ser Leu Ala Tyr Leu His Tyr Leu Arg Gly			
275	280	285	
Asp Met Val Asn Gln Gln Ile Gly Asp Val Val Ala Trp Val Arg Gly			
290	295	300	
Ser Tyr Ser Gly Val Lys Ile Ser Asn Leu Arg Tyr Asp Phe Glu Glu			

305	310	315	320
Ala Asp Gln Gln Ile Arg Glu Gly Lys Val Asp Ala Val Ala Phe Gly			
	325	330	335
Ala Lys Phe Ile Ala Asn Pro Asp Leu Val Glu Arg Ala Gln Gln Asn			
	340	345	350
Trp Pro Leu Asn Glu Pro Arg Pro Glu Thr Tyr Tyr Thr Arg Thr Ala			
	355	360	365
Val Gly Tyr Asn Asp Tyr Pro Thr Tyr Asn Lys			
	370	375	

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma cruzi

<400> 3
 Asn Arg Ile Ile Met Ala Pro Leu Thr Arg
 1 5 10

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma cruzi

<400> 4
 Asp His Arg Ile Pro Val Tyr Phe Ala Ala
 1 5 10

<210> 5

5/6

<211> 10

<212> PRT

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 5

Ile Ser Asn Leu Arg Tyr Asp Phe Glu Glu

1

5

10

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 6

cggaattcat ggcgacgttc cctgaacttc

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 7

ccgctcgagt tatttggtgt acgtcgggta

30

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Trypanosoma cruzi

6/6

<400> 8

atggcgacgt tccctgaact cc

22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 9

ttatttggtg tacgtcgggt a

21

DESCRIPCIÓN

FLAVOPROTEÍNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, MÉTODO VERMICIDA DE TAMIZAJE CON EL USO DEL MISMO Y DIAGNÓSTICO

5

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al desarrollo de una droga tripanocida efectiva para el tratamiento de la infección por *Trypanosoma*
10 *Cruzi* (enfermedad de Chagas) para la que ningún tratamiento efectivo esta corrientemente disponible; y un método de diagnóstico simple altamente específico. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método que desarrolla una droga tripanocida efectiva contra el *Trypanosoma Cruzi*, el patógeno de la enfermedad de Chagas,
15 utilizando la flavoproteína TcOYE presente en el *Trypanosoma Cruzi* y su proteína recombinante; y de prueba de la tasa metabólica (actividad de degradación) de la sustancia efectiva.

Además la invención se refiere a un método de diagnóstico
20 simple y específico de la infección por *Trypanosoma Cruzi* utilizando la secuencia del gen de la TcOYE y anticuerpos de ésta.

ANTECEDENTES DEL ARTE.

25 La enfermedad de Chagas es una infección por parásitos causada por el *Trypanosoma Cruzi* (World Health Organization , Weekly

268, 2002). Este protozoo infecta además de los humanos, a varios animales tales como perros, gatos, y armadillos, y se distribuye en muchos estados de US y sobre todo de América Central y América del sur. La infección en humanos ocurre principalmente en áreas del sur de Texas y ha sido reportada en 18 países de América Central y América del sur. El número de casos se estima entre 16 y 18 millones, produciendo 21.000 muertes cada año, y se incrementa en 300.000 cada año. Hay de 2.000.000 a 3.000.000 de pacientes infectados en el estado crónico, y las personas en áreas con alto riesgo de infección ascienden a 120.000.000.

Cuando el *Trypanosoma Cruzi* esta presente en la sangre humana, tiene kinetoplastos grandes y es del tipo tripomastigota con un cuerpo curvado en forma de C de 18 a 22 μm de longitud, y no sufre división o multiplicación. Sin embargo, en las células de los músculos, del hígado, del bazo y del corazón, éste es del tipo atricos con un cuerpo ligeramente elíptico de 2 a 4 μm de diámetro, tiene kinetoplastos grandes, y se multiplica por fisión binaria. Este tipo atricos se puede desarrollar en los tipos epimastigota y promastigota, pero este finalmente se desarrolla en el tipo tripomastigota. Cuando éste organismo es succionado por el bicho asesino vector, pasa en el cuerpo del tipo atricos al tipo *Trypanosoma metacíclico*, y se excreta en las heces. Se requieren cerca de 10 días para el desarrollo en el cuerpo del insecto.

importantes incluyen *Triatoma infestans* que se distribuye en la parte sur de América del sur incluyendo Argentina, *Rhodnius prolixus* distribuido sobre todo en la parte norte de América del sur , y América Central, y *Panstrongylus megistus* en Brasil. Cuando una persona es
 5 picada por tal insecto, esto causa dolor severo y comezón, y la infección ocurre cuando la persona rasca la herida de la picadura y penetra dentro de la herida el *Trypanosoma* que esta en las heces del insecto sobre la piel. El bicho asesino frecuentemente está en la casa, y succiona la sangre en la noche. Pueden ser un vector, los machos y las
 10 hembras adultos, los insectos jóvenes y las larvas.

Cuando un insecto pica e infecta con *Trypanosoma cruzi*, se forma en el sitio una protuberancia roja llamada chagoma. Los síntomas aparecen después de una o dos semanas de período latente. Los
 15 síntomas agudos ocurren principalmente en infantes. Pueden ocurrir tales condiciones como fiebre alta, erupción, linfadenitis, hepatoesplenomegalia, blefaredema, en particular facial y unilateral, llamado signo de Romaña, miocarditis y meningoencefalitis y algunas veces se produce la muerte después que la enfermedad ha progresado
 20 por 2 a 4 semanas . Un paciente infante que ha pasado por un estado agudo pasa a un estado crónico, mientras que un paciente adulto tiende a sufrir el curso de un estado crónico desde el comienzo. Ejemplos de los síntomas fundamentales durante el estado crónico incluyen miocarditis, hipertrofia cardiaca y megacolon.

25

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas incluye:

detección morfológica de los protozoarios utilizando frotis / coloración
 de Giemsa de los especímenes en sangre y en aspirado de nódulo
 linfoide, el método de detección de cultivo de protozoarios utilizando
 medios sintéticos de cultivo, el método de inoculación de animales el
 5 cual involucra inyectar el material muestreado en ratas o ratones con el
 fin que se multiplique en el cuerpo, el método de diagnóstico del vector
 el cual involucra el permitir que bichos asesinos no infectados
 succionen la sangre de un paciente y luego dos semanas mas tarde
 detectar los protozoarios que se han multiplicado en el intestino del
 10 insecto, o métodos inmunológicos de diagnóstico tales como reacción
 endodérmica, reacción de fijación de complemento, y técnica de
 anticuerpo fluorescente. Sin embargo, cualquiera de estos métodos
 requiere habilidad y procedimientos complejos, tienen sensibilidad
 confusa y problemas de especificidad.

15

El Nifurtimox y el Benznidazol se han utilizado en el tratamiento
 de la enfermedad de Chagas (Docampo, R. & Moreno, S. N. S., FASEB
 J. 45, p2471-2476, 1986; Henderson, G. B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci.
 USA, 85, p5374-5378, 1988; Docampo, R., Chem. Biol. Interactions, 73,
 20 p1-27, 1990). Sin embargo, estas drogas son efectivas solamente en la
 fase temprana de la infección (Braga M. S., et al., Rev. Inst. Med. Trop.
 S. Paulo, 42, p157-161, 2000), y no se conoce nada acerca del
 mecanismo de acción excepto que se ha sugerido que involucran
 radicales tales como oxígeno reactivo (Boveris, A. R. et al., Biochem J.,
 25 175: 431-439, 1978; Boveris, A. et al., Comp. Biochem Physiol., 61C:
 333-336, 1978; Boveris, A. et al., Comp. Biochem Physiol., 61C: 337-340, 1978).

57: 549-557, 1999). Además, éstos pueden causar efectos adversos fuertes y son carcinogénicos. Se piensa que las primaquinas anti-maláricas son efectivas en alguna extensión, pero otras drogas que son efectivas en el tratamiento de tripanosomiasis Africana y leishmaniasis son inefectivas contra la enfermedad de Chagas y no se ha desarrollado ninguna vacuna para el *Trypanosoma cruzi*. Por lo tanto, hay una necesidad mundial de investigar una nueva molécula blanco para el desarrollo de drogas encaminadas a la enfermedad de Chagas (World Health organization TDR news 67: 15, 2002).

10

Mientras tanto, los inventores han indicado las posibilidades que los protozoarios parásitos tales como el parásito de la malaria y el *Trypanosoma brucei*, el patógeno de la tripanosomiasis Africana, tengan un sistema metabólico para biosintetizar prostaglandinas (PGs), las cuales poseen acciones que inducen el sueño, la vaso-dilatación y la inmuno-supresión; a partir del ácido araquidónico, que el sistema de síntesis de PG en estos protozoarios no es sensible a inhibidores de la enzima mamífera (ciclo-oxigenasa), y que estos protozoarios pueden utilizar las PGs para establecer parasitismo en el huésped (Kubata B. K., et al., J. Exp. Med. 188: 1197-1202, 1998; Kubata B. K., et al., J. Exp. Med. 192: 1327-1337, 2000). Entonces, los inventores purificaron todos los lisatos de la fracción soluble del *Trypanosoma brucei*. La enzima *Trypanosoma brucei* PGF sintetasa (TbPGFS), que reduce la prostaglandina H₂ (PGH₂), el precursor común de varias PGs, a la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) y clonaron el gen y el cADN de ellas,

25

2000). Sin embargo, no fue claro si el *Trypanosoma cruzi*, el cual forma un citozoico, tiene o no una ruta biosintética para las PG como el parásito de la malaria y del *Trypanosoma brucei*, los cuales tienen rutas de infección y posiciones taxonómicas diferentes.

5

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

(Problemas a ser resueltos por la invención)

Es un objetivo de la presente invención proporcionar una nueva
10 molécula blanco para el desarrollo de drogas para la enfermedad de Chagas, así como también proporcionar un método de tamizaje de drogas terapéuticas para la infección por *Trypanosoma cruzi* y un diagnóstico.

15 Los inventores han realizado estudios intensivos para alcanzar el objetivo, y completaron la invención basados en los descubrimientos siguientes:

1) El *Trypanosoma cruzi* también tiene un sistema metabólico que
20 biosintetiza prostaglandinas (PG) a partir de ácido araquidónico, y el sistema sintético PG de éste protozoario no es inhibido por los inhibidores de la enzima mamífera (ciclo-oxigenasa). Es muy probable que el *Trypanosoma cruzi* también use PG para establecer parasitismo en el huésped como lo hace el *Trypanosoma brucei*.

25

2) La enzima soluble del *Trypanosoma cruzi* tiene una actividad

NADH, y la actividad no es absorbida por el anticuerpo para la enzima (TbPGFS) sintética *Trypanosoma* PGF. Por lo tanto no se ha detectado el *T. Cruzi* PGF_{2α} que sintetiza la proteína en otros protozoarios parásitos, tales como el *Trypanosoma brucei* y *leishmania*, o mamíferos
5 incluyendo los humanos, se creó que esto es propio del *Trypanosoma cruzi*.

3) La PGH₂ - PGF_{2α} reductasa purificada a partir de la fracción soluble del *Trypanosoma cruzi* es una flavoproteína que contiene FMN
10 equimolar.

4) El cADN de la proteína tiene una región de traducción de proteína de 1.140 pares de bases, y codifica una proteína de peso molecular de 42.260 que consiste de 379 residuos de aminoácidos.
15

5) A partir del análisis de homología basado en la secuencia de aminoácidos pronosticada, ésta enzima pertenece a la familia del gen de la antigua enzima amarilla (NADPH deshidrogenasa), la cual esta ausente en animales. Por lo tanto fue designada como TcOYE.

20

6) La TcOYE recombinante producida y purificada en grandes cantidades a través de la expresión en *E. Coli* utilizando el cADN exhibe una actividad PGH₂ - PGF_{2α} reductasa con actividad específica similar a aquella de la enzima purificada a partir de la fracción soluble de
25 *Trypanosoma cruzi*. Bajo condición anaerobia, la TcOYE recombinante

así como también menadiona, β -lapacona, nifurtimox, y 4-nitroquinolina-N-óxido.

7) La TcOYE convierte compuestos naftoquinona tales como menadiona y β -lapacona en radicales semiquinona por reducción de un electrón. De otro lado, cuando el sustrato es nifurtimox o 4-nitroquinolina-N-óxido, la TcOYE, dirige la reducción de dos electrones y no produce radicales.

8) Los anticuerpos policlonales para la TcOYE inmunoprecipitan casi completamente la actividad de la PGH_2 - $\text{PGF}_{2\alpha}$ reductasa presente en la fracción soluble del *Trypanosoma cruzi* y la actividad para reducir tales compuestos como menadiona, β -lapacona, nifurtimox, y 4-nitroquinolina-N-óxido.

15

Puesto que la TcOYE no ha sido encontrada en otros protozoarios parásitos, tales como *Trypanosoma brucei* y *leishmania*, o mamíferos incluyendo los humanos, esta puede proporcionar un buen blanco para el desarrollo de drogas tripanocidas específicas para *Trypanosoma cruzi*. En un tamizaje de reacción enzimática utilizando la TcOYE recombinante, los compuestos que sufrirán reducción de un electrón para producir radicales se espera tengan un efecto antiparasitario contra el *Trypanosoma cruzi*, mientras que los compuestos que sufran reducción de dos electrones se espera sean descompuestos fácilmente por el *Trypanosoma cruzi*.

En adición se puede aplicar la detección de la proteína TcOYE y el gen por un método inmunológico utilizando anticuerpos para la TcOYE y un método de biología molecular utilizando la secuencia de nucleótidos del gen de la TcOYE, tal como el método RT-PCR, en el desarrollo de un método altamente específico y simple para diagnosticar la infección por *Trypanosoma cruzi*.

(Soluciones)

La presente invención se refiere a la flavoproteína TcOYE derivada del *Trypanosoma cruzi*, que tiene la actividad enzimática para reducir la prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α}.

En un aspecto, la presente invención se refiere a la proteína recombinante de (a), (b), o (c), siguiente:

(a) una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2

b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una supresión, sustitución o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No: 2, y que tiene una actividad enzimática para reducir la prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α}.

c) una proteína que comprende un fragmento de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, y que tiene una actividad enzimática para reducir la prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α}.

La presente invención además se refiere al gen que codifica la proteína descrita antes.

En un aspecto, la presente invención se refiere al gen anterior
5 que consiste del ADN que contiene la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1.

La presente invención además se refiere a un anticuerpo para la proteína descrita antes.

10

La presente invención además se refiere a un método de tamizaje para drogas tripanocidas contra la infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende las etapas de:

- (i) preparar la proteína descrita antes y la prostaglandina H₂
- 15 (ii) Poner en contacto la proteína y la prostaglandina H₂ con un compuesto candidato en presencia de NADPH o NADH, y
- (iii) Examinar si se inhibe o no la reducción de la prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α}.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere además a un método de tamizaje de drogas tripanocidas contra la infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende la etapas de:

- (i) Incubar la proteína descrita antes con un compuesto candidato en presencia de NADPH o NADH, y
- 25 (ii) Determinar si el compuesto produce o no radicales como
.. . . .

La presente invención se refiere además a un método para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende las etapas de:

- 5 (i) incubar un espécimen o el extracto de un espécimen con el anticuerpo descrito antes, y
- (ii) examinar si se forma o no el complejo antígeno / anticuerpo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende las etapas de:

- 10 (i) hacer reaccionar un espécimen o el extracto de un espécimen con el gen descrito antes o un fragmento de éste, y
- (ii) examinar si ellos se hibridizan o no el uno con el otro.

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende las etapas de:

- 20 (i) preparar ADN recogido de un espécimen o cADN sintetizado a partir de mRNA en un espécimen utilizando transcriptasa inversa,
- (ii) realizar la PCR utilizando este ADN o cADN como una plantilla , y utilizando la secuencia de nucleótidos contenida en el cADN de la TcOYE de SEQ ID NO: 1 como un iniciador("primer") sentido y un iniciador contra-sentido,
- 25 (iii) examinar si se amplifica o no el cADN de la TcOYE.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una gráfica que muestra la producción de prostaglandina por el extracto crudo de *Trypanosoma cruzi*,

5

La Figura 2 es una vista de una cromatografía en capa delgada de sílica gel que detecta la [1-14c]-PGF_{2α} a partir de la reducción de la [1-14c]-PGH₂ en presencia de NADPH en la fracción soluble de *Trypanosoma cruzi*,

10

La Figura 3 es una vista de un perfil de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de la enzima purificada a partir de *Trypanosoma cruzi*, que muestra una banda uniforme en el peso molecular de 42.000;

15

La Figura 4 es una tabla que muestra la relación rendimiento y purificación de las etapas de purificación de la prostaglandina H₂-F_{2α} reductasa de *Trypanosoma cruzi*;

La Figura 5 es un espectro de absorción en la región visible del estado de oxidación de la PGH₂-F_{2α} reductasa purificada de *Trypanosoma cruzi*;

20

La Figura 6 es una vista esquemática que muestra la expresión de la TcOYE recombinante y un perfil de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS del espécimen en diferentes etapas de purificación;

25

La Figura 7 es una tabla que muestra la especificidad del sustrato de la reacción de reducción por la TcOYE recombinante;

La Figura 8 es una vista que muestra el espectro de resonancia espín-electrón de los radicales de semiquinona producidos a través de una reducción de un electrón de compuestos naftoquinona por la TcOYE y los radicales anión superóxido producidos a través de una reacción secundaria con oxígeno;

La Figura 9 es una gráfica que muestra la inhibición de la actividad de la $\text{PGH}_2\text{-F}_{2\alpha}$ reductasa de la TcOYE por compuestos naftoquinona y compuestos nitro hetero-ciclo;

La Figura 10 es una vista del ensayo de papel secante western (Western blot) utilizando un extracto crudo de *Trypanosoma* que indica la especificidad del anticuerpo anti-TcOYE;

La figura 11 es una vista esquemática de una cromatografía en capa delgada de sílica gel que muestra la inmunoabsorción de la actividad de la $\text{PGH}_2\text{-F}_{2\alpha}$ reductasa en la fracción soluble del *Trypanosoma cruzi* por un anticuerpo anti-TcOYE, y

La Figura 12 es una tabla que muestra la inmunoprecipitación por el anticuerpo anti-TcOYE de la actividad enzimática para reducir menadiona, β -lapacona, nifurtimox, y 4-nitroquinolina-N-óxido en el

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la flavoproteína TcOYE derivada del *Trypanosoma cruzi*, que tiene la actividad enzimática para
5 reducir la prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α} en presencia de NADPH o NADH.

La presente invención además se refiere a la proteína recombinante de (a), (b), o (c), siguiente:

- 10 a) una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2
- b) una proteína (algunas veces referida aquí después como ("variante TcOYE") que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene supresión, sustitución o adición de una o más aminoácidos en la
15 secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No: 2, y que tiene una actividad enzimática para reducir la prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α}.
- c) una proteína (algunas veces referida aquí después como ("fragmento TcOYE") que contiene un fragmento de la secuencia de
20 aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, y que tiene una actividad enzimática para reducir la prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α}.

Esta proteína (TcOYE) tiene las siguientes propiedades.

- 25 (1) Contiene flavin mononucleótido (FMN) equimolar, y tiene un peso

- (2) Tiene una actividad enzimática para reducir PGH_2 a $\text{PGF}_{2\alpha}$ en presencia de NADPH o NADH.
- (3) También reduce peróxido de hidrógeno, peróxido de butilo, menadiona, β -lapacona, 4-nitroquinolina-4-oxido, nifurtimox, fenazina
- 5 metosulfato (5-metil-fenazometil sulfato), mevinolina (lactona del ácido $2\beta,6\alpha$ -dimetil- 8α -(2-metil-1-oxo-butoxi)-mevlnico, ácido 12-oxo-fitodienónico (ácido 4-oxo- 5β -(2Z-pentenil)-2-ciclopenteno-1 β -octanónico). Ácido 9-oxo-10E, 12Z-octadecadienónico, econazol (1-[2-([4-clorofenil]metoxi)-2-(2,4-diclorofenil) etil-1H-imidazol]).
- 10 (4) Las reacciones de reducción incluyen reducción de un electrón en donde el sustrato produce radicales y reducción de dos electrones en donde no se forman radicales.
- (5) La actividad enzimática para reducir PGH_2 a $\text{PGF}_{2\alpha}$ es absorbida completamente por el anticuerpo anti-TcOYE.
- 15 (6) La actividad enzimática para reducir PGH_2 a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no es absorbida por el anticuerpo anti-TbPGFS.

Los inventores tuvieron éxito en la clonación del cADN que codifica la proteína TcOYE de *Trypanosoma cruzi*. El cADN tiene la

20 secuencia de bases de SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, la TcOYE tiene la secuencia de aminoácidos pronosticada de SEQ ID NO: 2.

Esta proteína (TcOYE) se puede producir aislándola de *Trypanosoma cruzi*, pero es preferible producir la proteína utilizando

25 tecnología de recombinación genética.

Se pueden utilizar Procarióticas para producir la proteína de la presente invención. Ejemplos de Procarióticas adecuados para la producción de la proteína de la presente invención incluyen *Escherichia coli* K-12 294 y otras cepas de *E. Coli*, especies de bacilos tales como

5 *Bacillus subtilis*, bacterias intestinales tales como *Salmonella typhymurium* y *Serratia marcescans*, varias especies de *Pseudomonas* y especies de *Streptomyces*.

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para controlar la

10 expresión del gen en Procarióticas incluyen β -lactmasa, lactosa, fosfatasa alcalina y promotores de triptófano (trp). También se pueden utilizar promotores híbridos adecuados tal como el promotor tac. Generalmente, se pueden unir otros promotores bacterianos con secuencias de base conocidas al ADN que codifica la proteína de la

15 presente invención mediante el uso de un ligante o un adaptador que proporcione cualquier sitio de restricción necesario.

El término "gen", como aquí se usa, se refiere a cualquier molécula, tal como ADN o ARN, que tiene una secuencia de ácido

20 nucleico con la secuencia descrita antes.

La presente invención también se refiere a un vector, y especialmente un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago y otros vectores convencionales usados en ingeniería genética que contiene el

25 ácido nucleico de la presente invención. Se pueden crear varios

..

boratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. , y
Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing
Associates and Wiley Interscience, N.Y., (1989), (1994). Los plásmidos
y vectores preferiblemente usados de acuerdo con la presente
5 invención incluyen aquellos conocidos por aquellos versados en el arte.

En una incorporación preferida, una molécula de ácido nucleico
de la presente invención en un vector se une a la secuencia control que
puede expresar el gen en células Procarióticas o Eucarióticas.

10

El término "secuencia control" se refiere a una secuencia
reguladora de ADN necesaria para la expresión de la secuencia
codificante a la cual ésta se une. Las propiedades de tal secuencia
control varían dependiendo del organismo huésped. En Procarióticas,
15 una secuencia control contiene generalmente un promotor, un sitio de
unión al ribosoma y un terminador. En Eucarióticas, una secuencia
control contiene generalmente un promotor, un terminador y en algunos
casos un trans-activador o un factor de transcripción. El término
"secuencia control" implica que por lo menos están contenidos todos los
20 componentes necesarios para la expresión, y puede contener otros
componentes útiles.

El término "unido operablemente" implica una posición que
permita al componente operar de la manera propuesta. Una secuencia
25 control "unida operablemente" a una secuencia codificante significa que

esta está unida de una manera tal que se pueda llevar a cabo la expresión de

de control. Cuando la secuencia de control es un promotor, se usa preferiblemente un ácido nucleico de doble hebra, como es bien conocido por aquellos versados en el arte.

5 Por lo tanto, preferiblemente el vector de acuerdo con la presente invención es un vector de expresión. "Vector de expresión" es un constructo que se puede usar para transformar una célula huésped seleccionada y expresar una secuencia codificante en la célula huésped seleccionada. Por ejemplo, el vector de expresión puede ser una
10 clonación o un vector de integración. Preferiblemente la expresión incluye transcripción de la molécula de ácido nucleico a un mRNA que se pueda traducir. Los factores de regulación que aseguran la expresión en células Procarióticas y/o Eucarióticas son conocidos por aquellos versados en el arte. En el caso de Eucarióticas, tales factores
15 reguladores contienen un promotor que asegura la iniciación de la transcripción y en algunos casos una señal poli A que asegura la terminación de la transcripción y la estabilización de transcriptos. Los promotores usados generalmente son un promotor de poliubiquitina y un promotor de actina. Otros factores reguladores pueden incluir un
20 mejorador de transcripción. Los factores reguladores posibles que permiten la expresión en células huéspedes Procarióticas incluyen, por ejemplo, promotores PL, lac, trp o tac en *E. Coli*. Ejemplos de factores reguladores apropiados conocidos por aquellos versados en el arte que permiten la expresión en células huésped Eucarióticas incluyen
25 promotores AOX1 o GAL1 en levaduras, promotores CMV- en células

pcDV1 (Pharmacia) de Okayama –Berg el cual es intrón de globina, y los vectores de expresión pCDM8, pRc / CMV, pcADN1, pcADN3 (Invitrogen) y pSPORT1 (GIBCO BRL). Otro sistema de expresión que se puede usar para expresar la proteína es un sistema insecto. Mediante e

5 tal sistema insecto que utiliza el virus de la polihedrosis nuclear de la *Autographa californica* (AcNPV) como un vector, un gen extraño se expresa en las células de *Spodoptera frugiperda* o de *Trichoplusia larvae*. La secuencia codificante del gen de la presente invención se puede clonar dentro de las regiones virales no esenciales tal como la

10 del gen de polihedrina, y colocar bajo el control del promotor de polihedrina. La inserción exitosa de la secuencia codificante inactivaría el gen de polihedrina y produce un virus recombinante carente en una proteína de recubrimiento. El virus recombinante se usa para infectar las células de *Spodoptera frugiperda* o de *Trichoplusia larvae*, en las

15 cuales se expresa la proteína de la presente invención (Smith, J. Virol. 46 (1983), 584; Engelhard, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91 (1994), 3224-3227). Ventajosamente, el vector de la presente invención descrito antes contiene un marcador que se puede seleccionar.

20 La presente invención además se refiere a una célula huésped que contiene el vector descrito antes o el gen de la invención en donde la secuencia de ácido nucleico es exógena a la célula huésped.

El término "exógeno" implica que una molécula de ácido nucleico es bien sea heteróloga a una célula huésped (lo que significa que ésta

25 es derivada de una célula o organismo que difiere sustancialmente de la célula huésped).

antecedente genético diferente de la contraparte natural de la molécula de ácido nucleico. Esto significa que si la molécula de ácido nucleico es homóloga a una célula huésped, esta no se sitúa en el sitio natural en el genoma de la célula huésped y sus alrededores, en particular, por genes diferentes. En este caso, la molécula de ácido nucleico puede estar bajo el control del promotor original o de un promotor heterólogo. El vector o gen de la presente invención contenido en una célula huésped se puede incorporar en el genoma de la célula huésped o mantener fuera del cromosoma de la célula. A este respecto el gen de la presente invención se puede utilizar para recuperar o crear un gen variante por recombinación homóloga (ed. Paszkowski, Homologous Recombination and Gene Slicing in Plants, Kluwer Academic Publishers (1994)).

De este modo, la presente invención se refiere a una célula huésped que contiene el vector o gen de la presente invención. La célula huésped puede ser cualquier célula Procariótica o Eucariótica incluyendo bacterias (arqueobacterias), insectos, hongos, plantas y animales. Preferiblemente, la célula del hongo es una especie *Saccharomyces*, y especialmente *Saccharomyces cerevisiae*.

El término "procariótica" se utiliza para incluir todas las bacterias que se pueden transformar o transfectar con ADN o ARN para la expresión de la proteína de la presente invención. Los huéspedes procarióticos pueden incluir, por ejemplo, bacterias gram-positivas y

células de levaduras, plantas superiores, insectos, y preferiblemente mamíferos. La proteína codificada por el polinucleótido de la presente invención puede estar o no glicosilada por el huésped utilizado para la producción de un recombinante. La proteína de la presente invención
5 puede tener o no la metionina como residuo del primer aminoácido. Cualquier técnica generalmente conocida por aquellos versados en el arte se puede usar para transformar o transfectar un huésped con el gen de la presente invención. Además, los métodos de fusión, preparación de un gen enlazado funcionalmente y la expresión en él,
10 por ejemplo en mamíferos y bacterias son conocidos por aquellos versados en el arte (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

La presente invención además se refiere al gen que codifica la
15 proteína de (a), (b), o (c) más adelante:

- (a) la flavoproteína TcOYE derivada del *Trypanosoma cruzi*, que tiene actividad enzimática para reducir prostaglandina H_2 a prostaglandina $F_{2\alpha}$ en presencia de NADPH o NADH.
- (b) Una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos
20 representada por SEQ ID NO: 2
- (c) Una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene supresión, sustitución o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, y que tiene actividad enzimática para reducir prostaglandina H_2 a
25 prostaglandina $F_{2\alpha}$.

(d) Una proteína que contiene un fragmento de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, y que tiene actividad enzimática para reducir prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α}.

5 En un aspecto, el gen que codifica la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 consiste de ADN que contiene la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1. pueden ser muchas secuencias de bases dependiendo de como el código genético este degenerado.

10

La invención además se refiere a un anticuerpo para:

(a) Una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2.

(b) Una proteína (algunas veces referida aquí después como "TcOYE variante") que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene supresión, sustitución o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, y que tiene actividad enzimática para reducir prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α,0}

20 (c) Una proteína que contiene un fragmento de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, y que tiene actividad enzimática para reducir prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α}.

Estas proteínas se pueden utilizar como una fuente de inmunidad para producir un anticuerpo de ellas. Estos anticuerpos pueden ser

única como también fragmentos Fab o los productos de una biblioteca de expresión de Fab. Se conocen varios métodos en el arte que se pueden usar para la producción de tales anticuerpos y fragmentos.

5 Los anticuerpos generados contra la proteína que corresponde a la secuencia de la presente invención se pueden obtener por inyección de la proteína directamente a un animal o por administración de la proteína a un animal, preferiblemente animal no humano. El anticuerpo anti-TcOYE obtenido de tal manera enlaza la TcOYE por si mismo, y
10 absorbe completamente la actividad de la PGH₂-PGF₂ reductasa α . Utilizando este método, aún una secuencia que codifica un fragmento de una proteína se puede utilizar para producir un anticuerpo que enlaza a la proteína natural completa.

15 Se puede usar cualquier tecnología que proporcione un anticuerpo producido por cultivo continuo de células para preparar un anticuerpo monoclonal. Ejemplo de tales tecnologías incluyen tecnología de hibridoma (Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497), tecnología trihoma, tecnología de hibridoma de células
20 β humanas (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72) y tecnología EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96).

25 La presente invención se refiere a un método de tamizaje de

- (i) preparar la proteína TcOYE y prostaglandina H_2 ,
- (ii) Incubar la proteína y la prostaglandina H_2 con un compuesto candidato en la presencia de NADPH o NADH, y
- (iii) examinar si se inhibe o no la reducción de prostaglandina H_2 a prostaglandina $F_{2\alpha}$.

Un ejemplo de la reacción es como sigue. Para la reacción bajo condición aeróbica, 1 μ l de una solución 500 μ M de [1-14C] PGH₂ (2.04 Gbq/mmol; acetona, DMSO o solución de dietilenglicol dimetil éter) se adiciona a 100 μ l de una solución amortiguadora de fosfato 100 mM (pH 7.0) que contiene un sistema de producción de NADPH (100 μ M de NADP, 100 μ M de glucosa-6-fosfato, 1 unidad de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa), TcOYE y un inhibidor, y se permite que reaccionen a 37°C por 2 minutos. Para la reacción bajo condición anaeróbica, después de burbujear la mezcla de reacción con gas argón por 5 minutos, se adiciona 100 μ M NADPH o NADH y 1 μ l de solución se PGH₂, y a la mezcla se le permite reaccionar en argón gaseoso a 37°C por 2 minutos.

250 μ l de una solución de parada (dietil éter: metanol: 2M de ácido cítrico (una solución mezcla 30:4:1)) a -20°C y una cantidad en exceso de sulfato de sodio anhidro se adicionan para detener la reacción, y el sustrato residual ([1-14C] PGH₂) y el producto de la reacción enzimática ([1-14C] PGF_{2 α}) se extraen en el éter al mismo tiempo. Parte (cerca de 50 μ l) de la capa de éter se aplica sobre una

(eluyente: dietil éter: metanol: ácido acético (una solución mezcla 90:2:1)), se realiza a temperatura refrigerada a -20°C . Después del desarrollo se hace autoradiografía de la placa de capa delgada utilizando un analizador de imagen FL2000 (Fuji Photo Film), y se
 5 calcula la relación del sustrato al producto para determinar la actividad enzimática.

Cuando se utiliza PGH2 no marcado, el sustrato y un producto después de la reacción se determinan por separación utilizando LC-MS (cromatografía líquida – espectrometría de masas; sistema Waters
 10 Alliance LC-MC, módulo de separación 2690, detector con arreglo de fotodiodos 996, detector de masas ZQ 4000; columna Inertsil – OD33), y se calcula la razón sustrato a producto similarmente que para determinar la actividad enzimática.

15 La reacción enzimática descrita anteriormente se conduce en presencia o ausencia de un inhibidor y se examina una disminución en la velocidad de reacción debida al inhibidor para determinar si se inhibe o no la reducción. A causa de que es muy probable que el *Trypanosoma cruzi* utilice prostaglandina para mantener el parasitismo
 20 en células huésped, se puede usar un inhibidor de TcOYE para inhibir el parasitismo por *Trypanosoma cruzi* en células huésped.

La presente invención además se refiere a un método de tamizaje de medicamentos tripanocidas contra infección por
 25 *Trypanosoma cruzi*, que comprende las etapas de:

a) Incubar la célula TcOYE con un compuesto candidato en la

- ii) Determinar si el compuesto produce o no radicales como resultado de la reducción de un electrón por la proteína.

Un mililitro de un amortiguador 100 mM de fosfato (pH 7,0) que
5 contiene TcOYE y un sustrato candidato se burbujea con gas argón por
cinco minutos para hacer un ambiente anaerobio. Luego, se adiciona a
la mezcla de reacción NADPH ó NADH 100 mM y se permite que
reaccionen a 37°C bajo condición anaerobia y se sigue la disminución
en NADPH ó NADH determinando la absorbancia a 340nm.

10

La generación de radicales como resultado de la reducción de un
electrón se determina como sigue. Cien mililitros de un amortiguador 5
mM de tris – HCl (pH 7,0) que contiene TcOYE y un sustrato candidato
se desplaza con gas argón por 5 minutos para hacer un ambiente
15 anaerobio. Luego, se adiciona NADPH ó NADH 10mM a la mezcla de
reacción y se permite reaccionar a 25°C ó 37°C por 3 minutos bajo
condición anaerobia. Parte de la mezcla de reacción se analiza con un
espectrómetro de resonancia de espín electrón (espectrómetro JEOL de
banda – X) para determinar la generación de radicales. Las condiciones
20 de medida y el método analítico se describen en el documento más
adelante. Se cree que los radicales producidos reaccionan con oxígeno
para generar radicales aniones superóxido (Moreno S.N.J. et al., J. Biol.
Chem. 259: 6298-6305, 1984), los cuales matan *Trypanosoma cruzi*.

25

La presente invención, además, se refiere a un método de
disentación de la interfaz por *Trypanosoma cruzi* que comprende las

- i) incubar un espécimen o el extracto de un espécimen con el anticuerpo anti- TcOYE descrito anteriormente, y
- ii) examinan si se forma ó no un complejo antígeno / anticuerpo.

5 Ejemplos de especímenes utilizados para diagnosis incluyen muestras de sangre de pacientes sospechosos con infección por *Trypanosoma cruzi*, biopsias tal como tejidos musculares, y fluidos corporales tal como fluido cerebroespinal. El término "extracto del espécimen" se refiere a una proteína, ADN ó ARN la cual se extrae del

10 espécimen descrito anteriormente.

Se permite que el espécimen descrito anteriormente reaccione con una solución amortiguadora hiposmótica para extraer TcOYE de infección por *Trypanosoma cruzi*. Se permite que el extracto reaccione

15 con un anticuerpo anti – TcOYE para determinar si se forma o no un complejo antígeno / anticuerpo.

Además, las secciones de tejido y los frotis se pueden dejar reaccionar con un anticuerpo anti TcOYE, luego con un material

20 fluorescente adecuado o con un anticuerpo secundario marcado con un enzima para visualizar la localización de *Trypanosoma cruzi*.

Se puede utilizar para la detección de un complejo antígeno – anticuer el papel secante Western ordinario, el método ELISA que

25 utiliza un anticuerpo inmovilizado o un método de coagulación de látex.

El método de coagulación inmunohistoquímica es comúnmente utilizado

puede utilizar para la detección en secciones de tejido y muestras de frotis.

La presente invención además se refiere a un método de
5 diagnostico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende las etapas de:

- (i) incubar un espécimen o el extracto de un espécimen con el gen que codifica TcOYE o un fragmento de él, y
- 10 (ii) examinar si ellos se hibridizan o no uno con el otro.

El ADN extraído del espécimen descrito anteriormente se digiere con varias enzimas de restricción, y los fragmentos de ADN se separan por electroforesis en gel de agarosa y se transcriben sobre una película
15 de nailon. Se permite que la película transcrita reaccione con sonda de cADN o ARN de la TcOYE marcada con un radioisótopo o digoxigenina para determinar la presencia de un gen enlazado a la sonda (papel secante southern). Alternativamente, el ARN extraído del espécimen descrito anteriormente se puede utilizar para determinar la presencia del
20 mRNA de la TcOYE de una manera similar (papel secante northern).

Para la detección del gen TcOYE o mRNA en secciones de tejido y frotis, se puede utilizar el método de hibridación in situ con una sonda cADN o ARN de TcOYE la cual está marcada con un radioisótopo o con
25 digoxigenina.

La presente invención además se refiere a un método de diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende las etapas de:

- 5 (i) preparar ADN recogido de un espécimen o cADN sintetizado a partir del mRNA en un espécimen utilizando transcriptasa inversa,
- (ii) realizar la PCR utilizando este ADN como plantilla, y utilizando la secuencia de nucleótidos contenida en el cADN de TcOYE de SEQ ID N0. 1 como un iniciador sentido y un iniciador antisentido, y
- 10 (iii) examinar si se amplifica o no el cADN de TcOYE.

Por ejemplo, un iniciador sentido (por ejemplo 5'-ATGGCGACGTTCCCTGAACTCC-3') (SEQ ID N0: 8) y un iniciador antisentido (por ejemplo, 5'-TTATTTGTTGTACGTCTGGGTA-3')(SEQ ID N0: 9) contenido en cADN de TcOYE se puede utilizar para la reacción de cadena de polimerasa (PCR) utilizando el ADN de una pequeña cantidad de fluidos corporales infectados con *Trypanosoma cruzi*, tales como sangre completa, tejido muscular y fluido cerebroespinal, como plantilla para determinar si se amplifica o no el cADN de TCOYE .El

15 método PCR incluye, por ejemplo, un ciclo de 95°C por 5 minutos para la desnaturalización del ADN, y 30 ciclos para amplificación cada uno que consiste de 95°C por 1 minuto para desnaturalización del ADN, 56°C por 30 segundos para el enlace del iniciador y 72°C por 1 minuto para elongación por la ADN polimerasa.

25

Los siguientes ejemplos además ilustran la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Sistema que sintetiza de prostaglandina en *Trypanosoma cruzi*

5 La forma vegetativa (epimastigoto) de *trypanosoma cruzi* cepa YNIH en el cuerpo del insecto (obtenida de Nacional Institute of Infections Diseases (1-23-1, Toyama. Shinjuku-ku, Tokio) se incubó por el método convencional (Nozaki T. et al., J. Biol. Chem. 276: 6516-6523, 2001) utilizando un medio de cultivo sintético. El cultivo de protozoos se
10 destruyó por un tratamiento hipoosmótico y se le permitió reaccionar con ácido araquidónico, y las PGs producidas fueron extraídas con un solvente orgánico y separadas/purificadas por HPLC. La determinación usando un kit comercial (Kubata B.X. et al., J. Exp. Med. 188:1197-1202, 1998) mostró que el extracto crudo de *Trypanosoma cruzi* produjo
15 PGD₂, PGE₂ y PGF_{2α} activamente (ver la figura 1). La producción de estos PGs se previno completamente por tratamiento con calor a 100°C por 20 minutos, pero no se afectó por Aspirina 3μM o Indometacina 42 μM, las cuales inhiben completamente la producción de PG en mamíferos.

20

Ejemplo 2

Actividad de la prostaglandina H₂-F_{2α} reductasa en *Trypanosoma cruzi*

Se permite que reaccionen [1-14c] – PGH₂ 40μM con NADPH
25 500 μM en amortiguador 0.1M de fosfato (pH 7.0) sometiendo a

PGH₂ se convierte en PGF_{2α} (ver la figura 2). Sin embargo, esta conversión no tiene lugar a menos que se adicione la fracción soluble de *Trypanosoma cruzi* desnaturalizada por el calor o NADPH.

5 **Ejemplo 3**

Purificación de la prostaglandina H₂-F_{2α} reductasa de *Trypanosoma cruzi* y secuenciación de aminoácidos de ella

La fracción soluble de *Trypanosoma cruzi* se sometió a
10 fraccionamiento con sulfato de amonio y se colectaron las fracciones
con 20 a 80% de saturación de sulfato de amonio. Estas fracciones
fueron fraccionadas mediante cromatografía de columna de filtración
por gel (Hiload 16/60 columna superdex 200 pg, Amersham Pharmacia
Biotec). La fracción activa se concentró en un concentrador Centricon
15 (Millipore) con un valor de interrupción de peso molecular 3000, se
dializó en amortiguador de fosfato 20mM (pH 7.0), se adsorbió por
cromatografía de columna de fase inversa (Resource PHE Columna de
Fase inversa, Amersham Pharmacia Biotec) equilibrada con
amortiguador de fosfato 20 mM (pH 7.0) que contiene 2 moles de
20 sulfato de amonio, y se eluyó con sulfato de amonio en gradiente
inverso, en el intervalo desde 2 moles hasta 0 moles, que contiene
0.1% de Tween 20. La fracción activa se dializó en amortiguador 20mM
de Tris-HCl (pH 8.0), se adsorbió en una columna de resina de
intercambio iónico (Hiprep 16/60 columna de intercambio iónico DEAE,
25 Amersham Pharmacia Biotec) equilibrada con este amortiguador y

(Hiload 16/60 columna superdex 200 pg, Amersham Pharmacia Biotec) de la fracción activa produjo una enzima purificada que muestra una banda uniforme a un peso molecular de 42000 sobre electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, con una actividad específica de cerca de 5 700 nmol /min /mg de proteína y un rendimiento en térmicos de la actividad de la $\text{PGH}_2\text{-F}_{2\alpha}$ reductasa de cerca de 1% con una relación de purificación de 1630 veces (ver las figuras 3 y 4).

La $\text{PGH}_2\text{-PGF}_{2\alpha}$ reductasa purificada enlaza un pigmento 10 amarillo. Su espectro de absorción en el intervalo visible tiene una absorción máxima cerca de 379 nm y 462 nm cuando está en estado de oxidado. El espectro de absorción visible desaparece cuando se adiciona NADPH 100 μM para reducir la enzima. Por lo tanto, la enzima es una flavoproteína que enlaza una molécula de flavina mono- 15 nucleótido (FMN) por molécula de la enzima (ver figura 5).

Cuando la enzima purificada se trato con lisil endopeptidasa (Rosenfeld, J. et al., Anal, Biochem., 203: 173-174,1992) y se separó por cromatografía en fase inversa, se recogieron tres pépticos, cuyas 20 secuencias de aminoácidos se determinaron como se explica mas adelante.

Péptido 1: AsnArgIleIleMetAlaProLeuThrArg (SEQ ID N0: 3)

Péptido 2: AspHisArgIleProValTyrPheAlaAla (SEQ ID N0: 4)

Ejemplo 4

Expresión de una proteína recombinante utilizando clonación de cADN de TcOYE y *E. coli*.

5 La búsqueda en la base de datos de EMBL/GenBank/DDBJ para las secuencias de aminoácidos de los tres péptidos obtenidos revelaron dos de los tres péptidos, y el péptido residual con un residuo de aminoácido diferente, en la región de traducción de la proteína predicha del gen 1.686bp nombrado como U31282 (Catmull, J. y Donelson, J. E.,
10 base de datos EMBL/GenBank/DDBJ, 1995, se encontró un gen homólogo del gen de la antigua enzima amarilla de las levaduras con el tipo citozoico de *Trypanosoma cruzi*, descrito como una reductasa de *Trypanosoma cruzi*).

15 La secuencia de bases mas adelante se sintetizó a partir de la secuencia de nucleótidos de la región de traducción de la proteína de de *Trypanosoma cruzi* reductasa como un iniciador sentido para el cual se adicionó en extremo 5' una secuencia de la enzima de restricción EcoRI, 5'-CGGAATTCATGGCGACGTTCCCTGAACTTC-3' (SEQ ID
20 N0: 6) y la secuencia de bases más adelante como un iniciador antisentido para el cual se adicionó al extremo 5' una secuencia de la enzima de restricción XhoI, 5'-CCGCTCGAGTTATTTGTTGTACGTCGGGTA-3' (SEQ ID N0: 7).

25 El ARN total se extrajo de la forma vegetativa del *Trypanosoma*

oligo adaptador-dT (Takara Shuzo Co., Ltd.) para sintetizar cADN de banda única utilizando transcriptasa inversa de virus de mieloblastosis aviar (Takara Shuzo Co., Ltd.). La PCR que utiliza los iniciadores sentido y antisentido sintéticos descritos anteriormente produjeron una
5 amplificación del cADN que contiene una región de traducción de proteína de un peso molecular de 42,260 que comprende 379 residuos de aminoácidos (SEQ ID Nos. 1 y 2). La secuencia de nucleótidos del cADN obtenida se diferencia de la U31282 en 6 sitios, uno de los cuales estuvo acompañado por variación en los residuos de aminoácidos. Las
10 secuencias totales de aminoácidos de los 3 péptidos determinados con la enzima purificada estuvieron contenidas en la región de traducción de la proteína de cADN obtenido.

El cADN obtenido se insertó en el sitio EcoRI/XhoI del vector
15 pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotec) para producir un vector de expresión de proteína.

Cuando *E. coli* BL21 se transformó con este vector y se incubó por 7 horas en la presencia de isopropil-β-D-tiogalactosilpiranosido 0.5
20 mM, el TcOYE recombinante se expresó en la fracción soluble de *E. coli* como una proteína de fusión con glutathion transferasa. Las células *E. coli* se destruyeron ultrasónicamente y el extracto se sometió a columna por afinidad de glutathion (glutathion Sepharose 4B, Amersham Pharmacia Biotec) para adsorber la proteína de fusión sobre la resina,
25 y, después del lavado, la columna se trató con trombina para recuperar

Ejemplo 5

Especificidad del sustrato de la reacción de reducción por la TcOYE recombinante.

5 La actividad de la PGH₂-F_{2α} reductasa de la TcOYE recombinante fue 766 nmol/minuto/mg de proteína, un valor de actividad específica que representa que es casi similar al espécimen purificado de la fracción soluble de *Trypanosoma cruzi*.

10 Se permitió que las TcOYE recombinante reaccionara con NADPH o NADH 500 μM burbujeando argón en un amortiguador 0.1 M de fosfato (pH 7.0) y se midió la disminución de la absorción a 340 nm para determinar la especificidad del sustrato para varios compuestos; los resultados mostraron que la TcOYE reduce el peróxido de hidrógeno y el peróxido de butilo (ver Figura 7). La TcOYE también reduce quinonas anti-tripanosomales y compuestos nitro, tales como menadiona, β-lapacona, 4-nitroquinolina-4-óxido, nifurtimox, metosulfato de fenazina (5-metil-fenazometilsulfato), mevinolina (lactona del ácido 2β, 6α-dimetil-8α-(2-metil-1-oxo-butoxi)-mevinico), ácido 12-oxo-
15 fitodienólico (ácido 4-oxo-5β-(2Z-pentenil)-2-ciclopenteno-1β-octanoico), ácido 9-oxo-10E,12Z-octadecadienólico, y econazol (1-[2-([4-clorofenil]metoxi)-2-(2,4-diclorofenil)etil-1H-imidazol)]. Sin embargo, no reduce benznidazol o cristal violeta.

25

(1-[2-([4-clorofenil]metoxi)-2-(2,4-diclorofenil)etil-1H-imidazol)]

El espectro de resonancia de espín electrón del producto de la reacción de la TcOYE se midió con un espectrómetro JEOL banda X (JEOL Ltd.) (Moreno, S. N. J. et al., J. Biol. Chem. 259: 6298-6305, 1984); se detectó una señal que mostró que los compuestos naftoquinona tales como menadiona y β -lapacona sufrieron una reducción de un electrón y produjeron radicales semiquinona. Los radicales semiquinona reaccionaron con oxígeno y produjeron radicales anión superóxido, los cuales mataron los protozoos (ver Figura 8). De otro lado, los compuestos nitroheterocíclicos, tales como nifurtimox, 4-nitroquinolina-N-óxido o mevinolina, sufrieron una reducción de 2 electrones y no produjeron radicales.

Los compuestos de Naftoquinona y compuestos nitro heterocíclicos que son reducidos por TcOYE inhiben la actividad reductora de $\text{PGH}_2\text{-F}_{2\alpha}$ de TcOYE de una manera dependiente de la dosis. El Nifurtimox inhibe la actividad mas fuertemente y el efecto de inhibición de menadiona, la β -lapacona y el 4-nitroquinolina-N-óxido es débil (ver Figura 9).

20

Ejemplo 6

Producción de anticuerpo anti-TcOYE

El antígeno de la TcOYE recombinante (300 μg) disuelto en amortiguador de Tris-HCl 5mM (pH 8.0) se mezcló con una cantidad

25

hembra Kb1 en 20 sitios subcutáneos en el hombro para inmunización. Entonces, cada dos semanas se adicionó una dosis igual del antígeno emulsificado en una cantidad igual de adyuvante incompleto de Freund, se administró un total 4 veces. 4 semanas después de segunda
 5 inmunización, la sangre fue muestreada de la vena de la oreja del conejo. La muestra de sangre se dejó en reposo toda la noche a 4°C y entonces el suero se colectó por separación centrífuga (1000 X g, por 20 minutos). El suero sanguíneo se separó por cromatografía en sefarosa de proteína A (Amersham Pharmacia Biotech), y la fracción
 10 IgG se purificó.

Ejemplo 7

Anticuerpo Anti-TcOYE y ensayo de inmunoabsorción de la actividad que metaboliza la droga utilizando la misma.

15

El anticuerpo obtenido por inmunización del conejo con la TcOYE purificada mostró reacción cruzada inmunológica con solamente TcOYE en el ensayo de papel secante western utilizando el extracto crudo de *Trypanosoma cruzi*. No se detectó ninguna proteína en el extracto
 20 crudo de *Trypanosoma brucei* o leishmania que presente reacción cruzada inmunológica o enlace con TbPGFS. Al contrario, el anticuerpo obtenido por inmunización de un conejo con el TbPGFS recombinante no reconoció la TcOYE, y se detectó que ninguna proteína muestra reacción cruzada inmunológica en el extracto crudo de *Trypanosoma*
 25 *cruzi* (ver Figura 10).

En un ensayo de inmunoabsorción utilizando el extracto crudo de

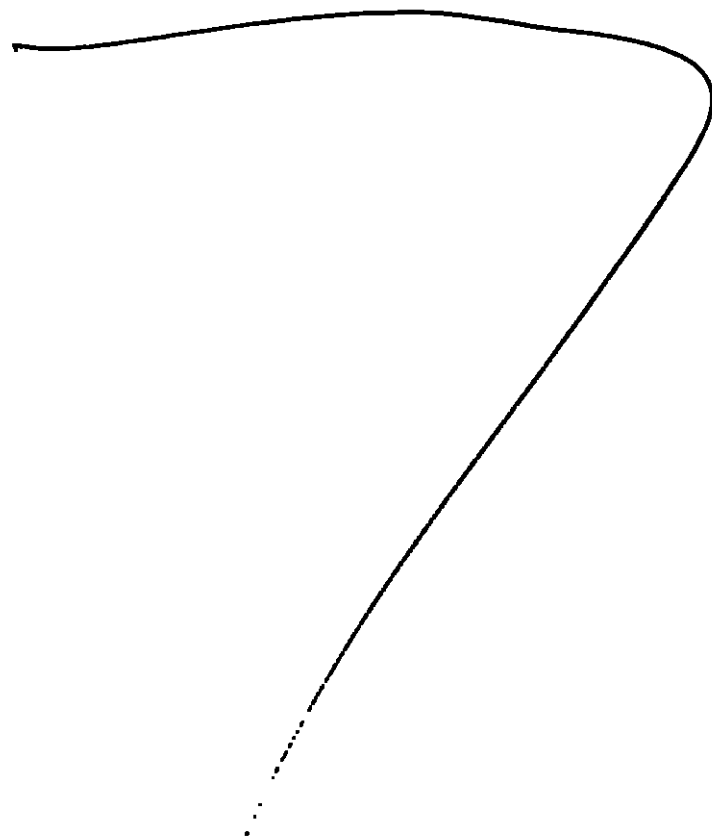
PGH₂-F_{2α} reductasa casi completamente, pero el anticuerpo anti-TbPGFS no tuvo efecto sobre la actividad (ver Figura 11). El anticuerpo anti-TcOYE inmunoprecipitó casi completamente la actividad enzimática para reducir menadiona, β-lapacona, nifurtimox, 4-nitroquinolina-N-
5 óxido en el extracto crudo de *Trypanosoma cruzi* (ver Figura 12).

Estos resultados muestran que la actividad de la PGH₂-PGF_{2α} reductasa y la actividad para reducir tales compuestos como menadiona, β-lapacona, nifurtimox y 4 -nitroquinolina-N-óxido en el
10 extracto crudo de *Trypanosoma cruzi* son mediados en su mayor parte por la TcOYE.

15

20

25



REIVINDICACIONES

1. Una flavoproteína (TcOYE) derivada de *Trypanosoma Cruzi*. Que tiene una actividad enzimática para reducir prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α}.
5
2. Una proteína recombinante de (a), (b) o (c) más abajo mencionadas:
 - a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 2
10
 - b) una proteína (algunas veces referida aquí después como "variante TcOYE") que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene supresión, sustitución o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No: 2, y que tiene una actividad enzimática para reducir la prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α}. y
15
 - c) una proteína que comprende un fragmento de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 2, y que tiene una actividad enzimática para reducir la prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α}.
20
3. Un gen que codifica la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2.
4. El gen de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende ADN
25 que comprende la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1.

5. Un anticuerpo para la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2.

6. Un método de tamizaje de drogas tripanocidas para la infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende las etapas de:

- (i) preparar la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 y la prostaglandina H₂
- (ii) incubar la proteína y la prostaglandina H₂ con un compuesto candidato en presencia de NADPH o NADH, y
- (iii) examinar si se inhibe o no la reducción de la prostaglandina H₂ a prostaglandina F_{2α}.

7. Un método de tamizaje de drogas tripanocidas para la infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende las etapas de:

- (i) incubar la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 con un compuesto candidato en presencia de NADPH o NADH, y
- (ii) determinar si el compuesto produce o no radicales como resultado de una reducción de un electrón por la proteína.

8. Un método para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende las etapas de:

- (i) incubar un espécimen o el extracto de un espécimen con el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, y
- (ii) examinar si se forma o no el complejo antígeno / anticuerpo.

9. Un método para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende las etapas de:

- (i) incubar un espécimen o el extracto de un espécimen con el gen de acuerdo con la reivindicación 3 o un fragmento de éste, y
- (ii) examinar si el espécimen o el extracto del espécimen hibridizan o no con el gen o un fragmento de éste.

10. Un método para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende las etapas de:

- (i) preparar ADN recogido de un espécimen o cADN sintetizado a partir de mRNA en un espécimen utilizando transcriptasa inversa,
- (ii) realizar la PCR utilizando dicho ADN o dicho cADN como una plantilla , y utilizando la secuencia de nucleótidos contenida en el cADN de la TcOYE de SEQ ID NO: 1 como un iniciador ("primer") sentido y un iniciador contra-sentido,
- (iii) examinar si se amplifica o no el cADN de la TcOYE

RESUMEN

Se tiene por objeto proporcionar un método para el diagnóstico de la infección con la enfermedad de Chagas por tamizaje de drogas tripanocidas para *Trypanosoma cruzi* que es el patógeno de la enfermedad de Chagas . Utilizando una flavoproteína TcOYE específica para *Trypanosoma cruzi*, se tamiza una droga tripanocida efectiva contra el *Trypanosoma cruzi*. Utilizando la secuencia del gen de la TcOYE y un anticuerpo para ésta, se diagnostica la infección por

5

10 *Trypanosoma cruzi*.

Fig. 1

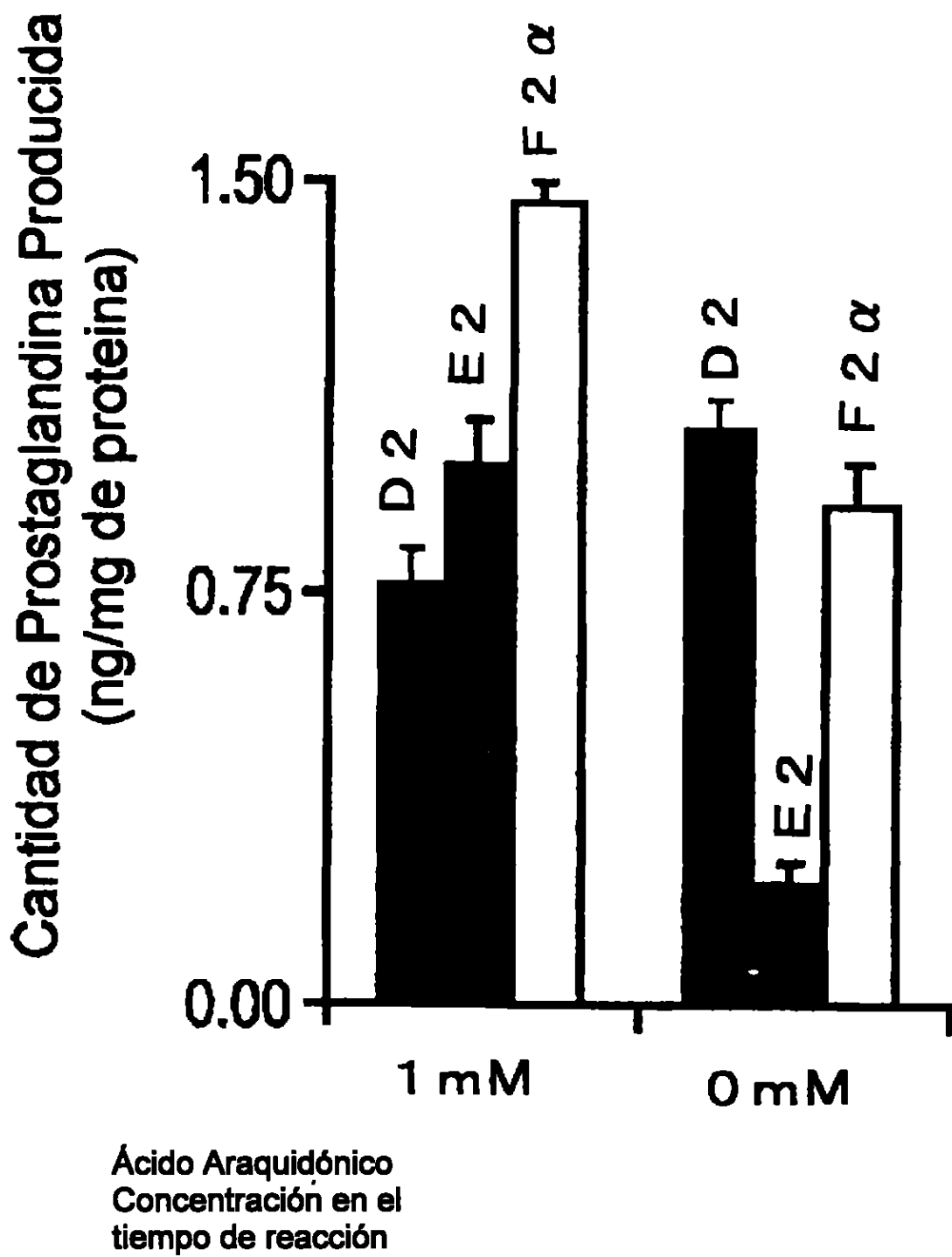
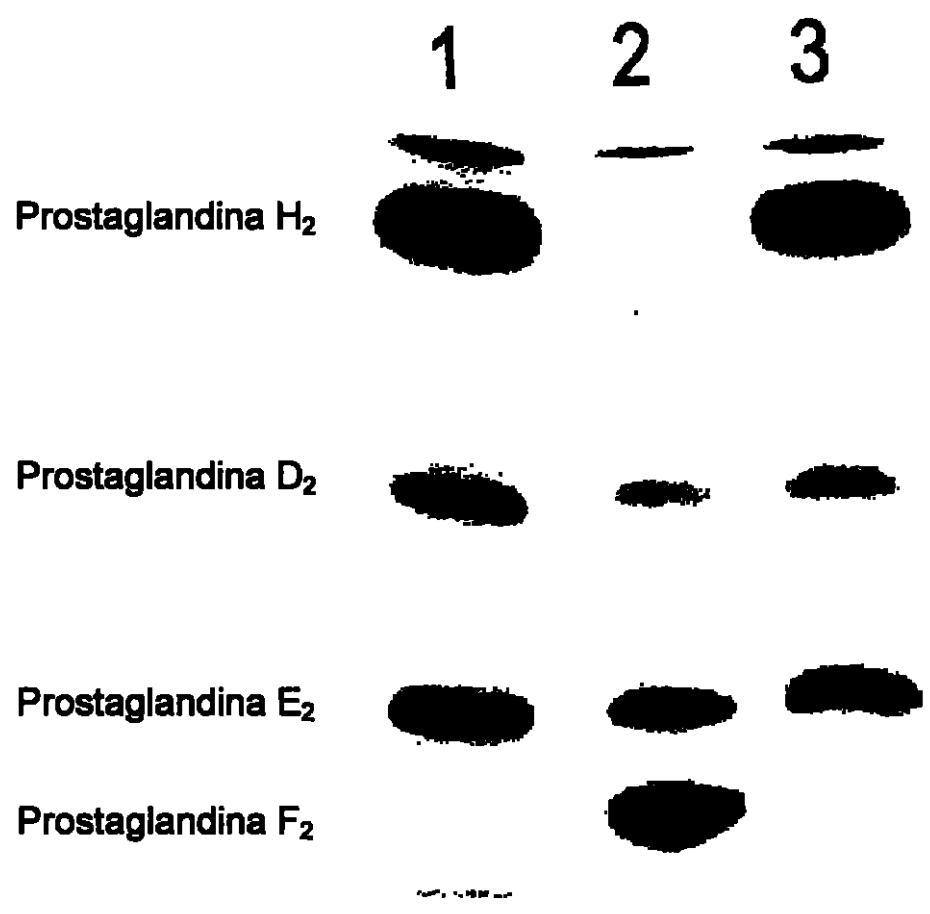
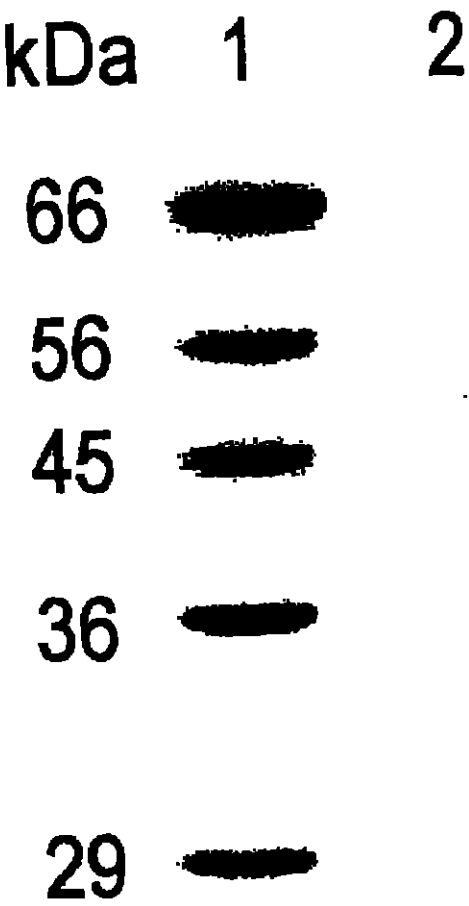


Fig. 2



- 1. Sin enzima
- 2. Extracto de Trypanosoma Cruzi
- 3. Extracto de Trypanosoma Cruzi después de tratamiento con calor

Fig. 3



- 1. Proteína marcadora de peso molecular
- 2. Enzima Purificada

Fig. 4

a de Purificación	Proteína (mg)	Actividad enzimática (nmol/min)	Actividad específica (nmol/mg de proteína)	Relación de Purificación
in Soluble	171.0	154	0.9	1.0
in en sulfato de entre el 20-80% iración	127.0	150	1.2	1.3
lex 200	113.0	150	1.2	1.3
tograma de ración tograma bico	8.0	170	25.0	28.0
tograma de mbio iónico DEAE	2.8	180	64.0	71.0
tograma de ración Superdex gundo tiempo	0.3	210	700.0	778.0

107

Fig. 5

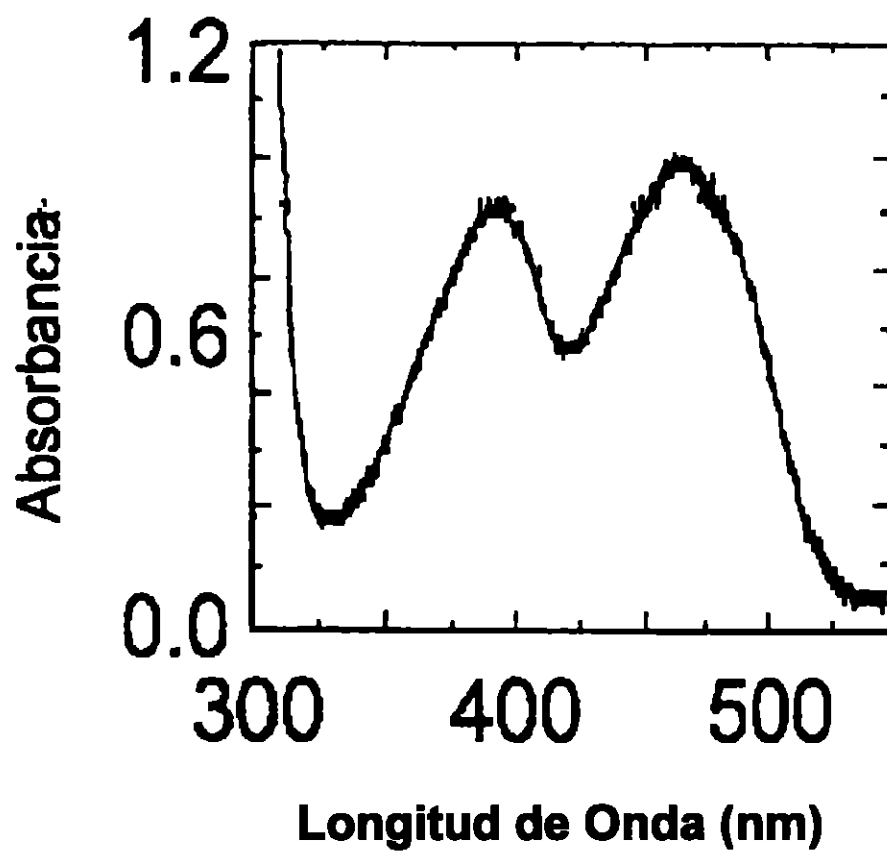
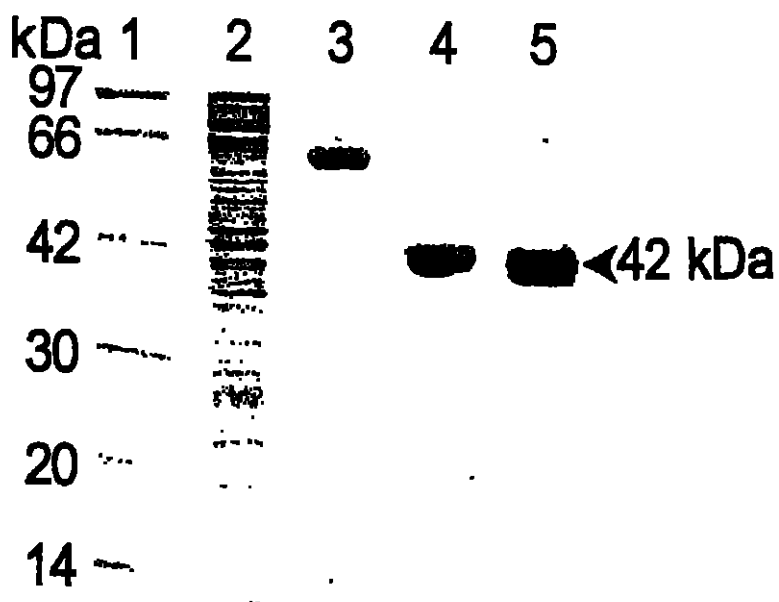


Fig. 6



1. Proteína marcadora de Peso Molecular
2. Extracto Crudo de E. coli después de transformación
3. Extracto Crudo de E. coli que expresa la TcOYE recombinante
4. TcOYE recombinante reunido por tratamiento con trombina
5. Estándar Purificado de la TcOYE recombinante.

Fig. 7
Especificidad del sustrato de reducción por la TcOYE recombinante

Sustrato	Cofactor (10µM)	Km (µM)	Vmax/actividad específica (nmol/min/mg)
9,11- endoperóxido PGH ₂	NADH	-	554
	NADPH	5.0	766
Peróxido de Hidrogeno BPH ^a	NADPH	2.3	99
	NADPH	n.d.	282
Menadiona	NADH	-	499
	NADPH	0.82	700
β-Lapacona	NADH	0.17	650
	NADPH	-	433
4-nitroquinolina-N-oxido	NADH	-	759
	NADPH	9.5	1110
Nifurtimox	NADH	-	290
	NADPH	19.0	353
Fenazina metosulfato ^b	NADPH	10.4	235
Mevinolina ^c	NADH	n.d.	555
Acido12-oxo-fitodienónico	NADPH	n.d.	152
9-oxo ODE ^d	NADPH	n.d.	54
Econazol ^f	NADH	n.d.	43
Benznidazol	-	n.d.	N.D.
Miconazol ^g	-	n.d.	N.D.
Ketoconazol ^h	-	n.d.	N.D.
Cristal violeta ⁱ	-	n.d.	N.D.
BHT ^j	-	n.d.	N.D.
BHA ^k	-	n.d.	N.D.

a: t-butil hidroperóxido, b: 5-metil-fenazometilsulfato, c: lactona del ácido 2- β,6α-dimetil-8α-(2-metil-1-oxo-butoxi)-mevinico, d: ácido 4-oxo-5β-(2Z-pentenil)-2-siclopenteno-1β-octanoico, e: ácido 9-oxo-10E,12Z-octadecadienoico, f: 1-[2-([4-clorofenil]metoxi)-2-(2,4-diclorofenil)etil-1H-imidazol], g: 1-[2,4-dicloroβ-([2,4-doclorobenzil]-oxo)fenetil]midazol, h: cis-1-acetil-4[4-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il-metil)-1,3-dioxolano-4-ilmetoxi]fenilpiperazina], i: cloruro de N-[4-[bis[4-(dimetilamino)fenil]metileno]-2,5-cilohexadieno-1-il-iden-N-metil-metano aluminio, j: (2,6di-ter-butil-para-cresol), k: [2(3)-ter-butil-4-hidroxianisol
N.D.: no detectado
n.d.: no medido

Fig. 8

Menadiona

$$g = 2.0044$$

Espectro Observado



6 G

Espectro Teórico



B-lapachone

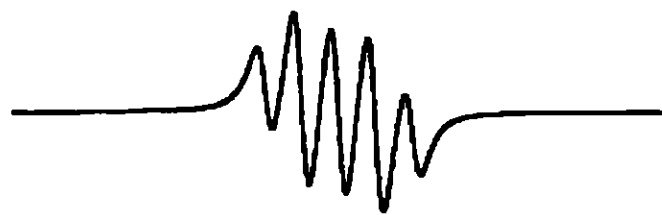
$$g = 2.0046$$

Espectro observado



6 G

Espectro teórico



Radical Superóxido

Espectro Observado

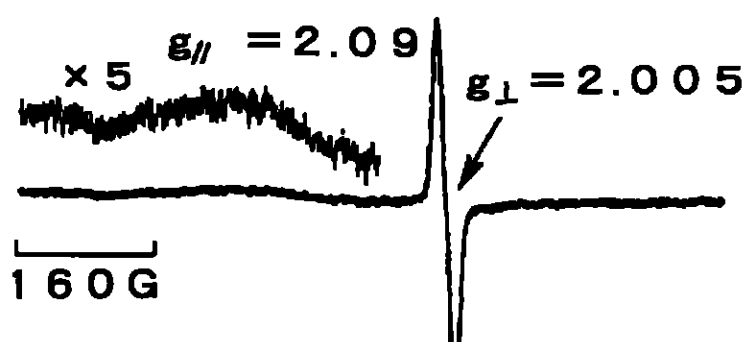


Fig. 9

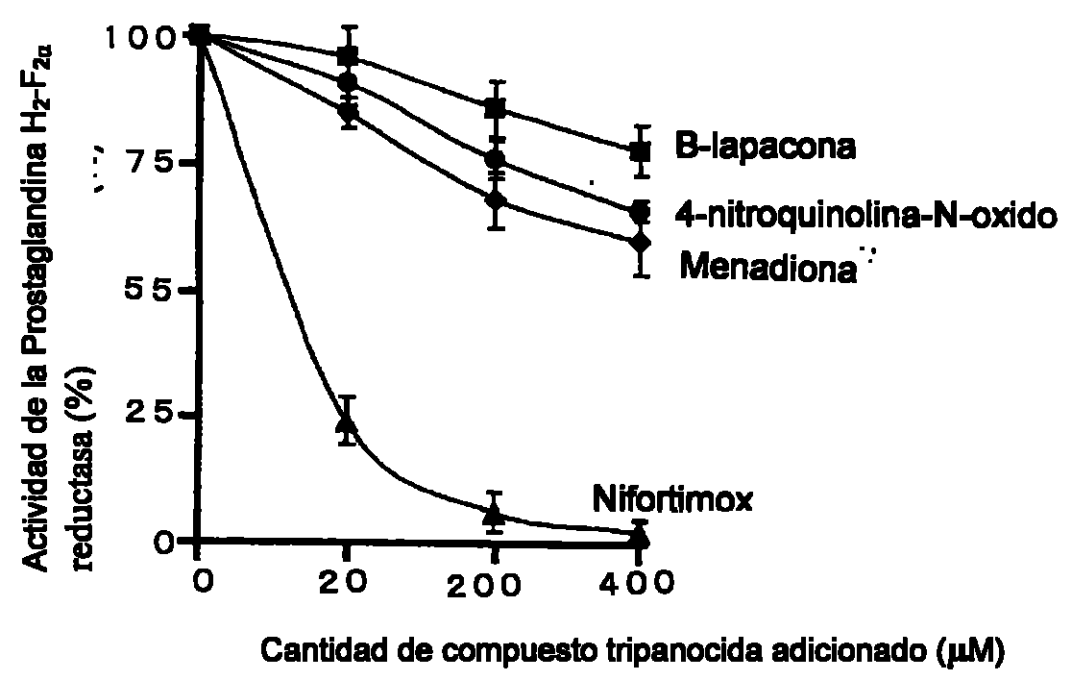
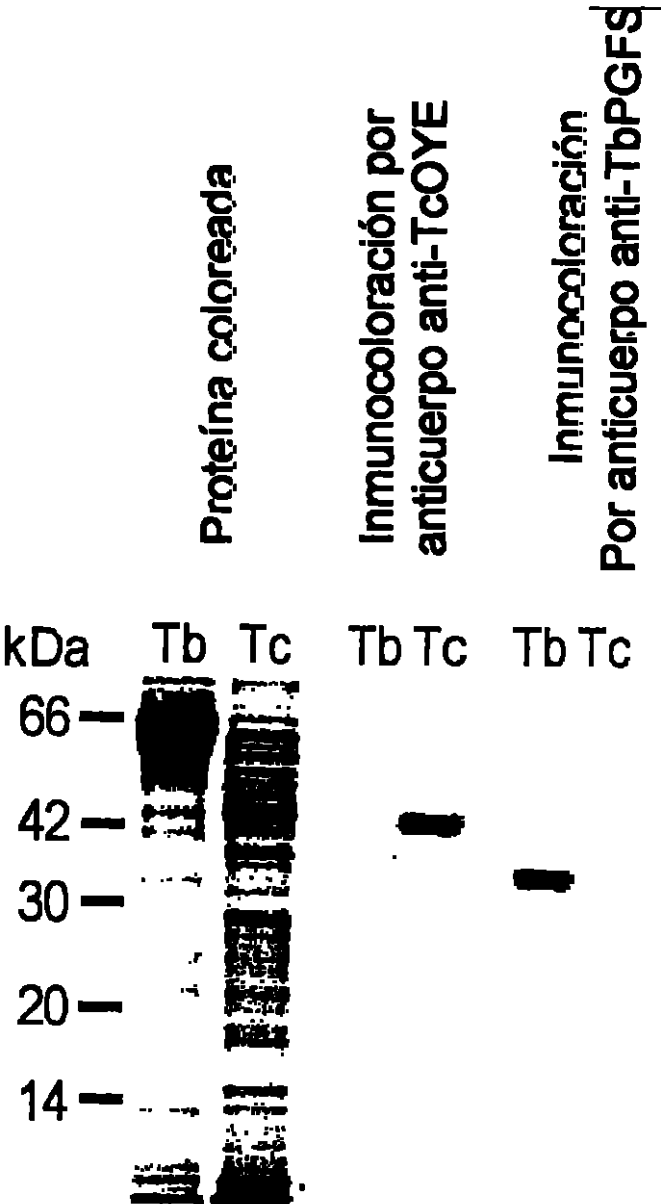
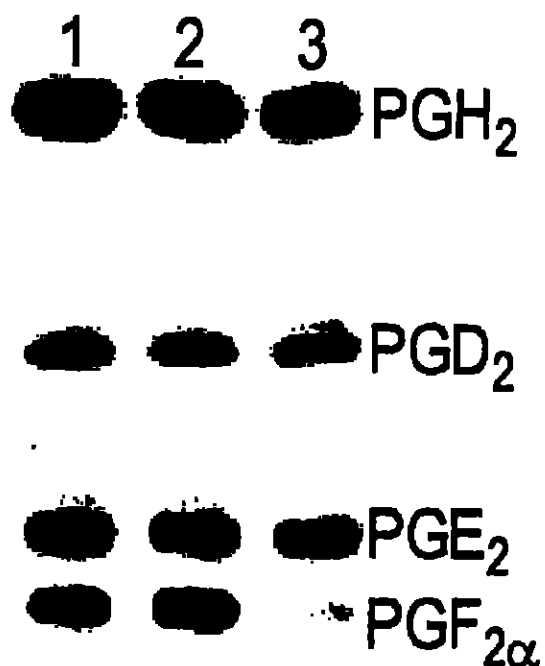


Fig. 10



Tb: Extracto Crudo de Tripanosoma brucei
Tc: Extracto Crudo de Tripanosoma Cruzi

Fig. 11



1. Extracto crudo de *Trypanosoma Cruzi* después de la reacción con la IgG control
2. Extracto crudo de *Trypanosoma Cruzi* después de la reacción con anticuerpo anti-TbPGFS
3. Extracto crudo de *Trypanosoma Cruzi* después de la reacción con anticuerpo anti-TcOYE

Fig.12

Inmunoprecipitación por el anticuerpo anti-TcOYE de la actividad enzimática para reducir menadiona β lapacona, nifurtimox, 4-nitroquinol na en el extracto Crudo de Trypanosoma cruzi

ra	Actividad enzimática persistente (%)			
	Menadiona	β lapacona	nifurtimox	4-nitroquinol na
o de Trypanosoma cruzi is de la reacción con rpo anti-TcOYE.	ª N.D.	10(±2)	N.D.	N.D.
o de Trypanosoma cruzi is de la reacción con rpo anti-TbPGFS.	98(±8)	103(±3)	100(±5)	100(±10)
o de Trypanosoma cruzi is de la reacción con IgG control.	100(±4)	100(±6)	100(±10)	100(±6)

75

1/6

LISTAS DE SECUENCIAS

<110> Instituto de Biociencias de Osaka

<110> JAPON REPRESENTADO POR EL DIRECTOR GENERAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

<120> FLAVOPROTEINA DE TRYPANOSOMA CRUZI, METODO PARA TAMIZAJE DE UN AGENTE EXTERMINADOR DE EL Y MÈTODO PARA DIAGNOSTICAR LA INFECCION POR EL.

<130> 664102

<150> JP 2002-299284

<151> 2002-10-11

<160> 9

<210> 1

<211> 1140

<212> DNA

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 1

atggcgacgt tccctgaact tctgcggccc ctcaaattgg ggcgctacac acttcgtaat 60

cggattatta tggctccctt gacgcgttc caggcaacag aagatgatca tgtaccaagg 120

acggaatcga tgctgaagta ctacgaagac cgggcatctg caggtcttat cattgccgag 180

gogacgatgg tccagccaaa ctacactggg ttctcacgg agcctggcat ttactccgat 240

gcgcagattg aggagtggag aaagatcgtg gacgcggtac acaaaaaggg tggccttata 300

ttctgcaac tcattcacgc tggtcgagcc gggattccgg agaagatcct tcagcagtcg 360

aagagtgacc aggatcccct tgc tggg cgc ctgcttgccg cgagtgccat tccattaag 420
gaccatcgga ttctgccta tttgctgcg agcggagaaa aggagacctt cgggtgtcca 480
gaggagctca cggatgacga agtcggggac ggtatcatcc cattgtttgt ggagggggcc 540
aaaaacgcca tctttaaggc tgggtttgat ggcgttgaga ttcatggagc caacggctac 600
ttactggacg ccttttttcg cgaatcttcc aacaagcgcc agtcgggtcc gtacgccgga 660
acgaccatcg acacacgatg ccaactcatc tacgatgtca ccaaaagcgt ctgcgatgcc 720
gtgggaagtg accgtgtggg gctccgcata tccccactaa acggcgtgca tgggatgatt 780
gactcgaacc cggaggcact aaccaagcat ctatgcaaga aaattgagcc actttcgctt 840
gcctatctgc attacttgcg tggcgacatg gtcaaccagc agattgggtga cgttgtggcg 900
tgggttcgtg gaagttacag cgggtgtaaaa atatccaact tgcgtacga ttccaagag 960
gcagaccagc aaatacggga aggaaaagtc gacgccgtgg ctttggcgc caagttcatt 1020
gcgaaccccg atctcgttga aagggcccaa caaaactggc cctcaacga gcgcgacca 1080
gaaacatact acacaagaac agcagtcgga tacaacgatt acccgacgta caacaataa 1140

<210> 2

<211> 379

<212> PRT

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 2

Met Ala Thr Phe Pro Glu Leu Leu Arg Pro Leu Lys Leu Gly Arg Tyr

1 5 10 15
Thr Leu Arg Asn Arg Ile Ile Met Ala Pro Leu Thr Arg Cys Gln Ala

20 25 30
Thr Glu Asp Asp His Val Pro Arg Thr Glu Ser Met Leu Lys Tyr Tyr

35 40 45
Glu Asp Arg Ala Ser Ala Gly Leu Ile Ile Ala Glu Ala Thr Met Val

50 55 60
Gln Pro Asn Tyr Thr Gly Phe Leu Thr Glu Pro Gly Ile Tyr Ser Asp

65 70 75 80

3/6

Ala Gln Ile Glu Glu Trp Arg Lys Ile Val Asp Ala Val His Lys Lys

85 90 95
Gly Gly Leu Ile Phe Leu Gln Leu Ile His Ala Gly Arg Ala Gly Ile

100 105 110
Pro Glu Lys Ile Leu Gln Gln Ser Lys Ser Asp Gln Asp Pro Leu Ala

115 120 125
Gly Arg Leu Leu Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ile Lys Asp His Arg Ile

130 135 140
Pro Ala Tyr Phe Ala Ala Ser Gly Glu Lys Glu Thr Tyr Gly Val Pro

145 150 155 160
Glu Glu Leu Thr Asp Asp Glu Val Arg Asp Gly Ile Ile Pro Leu Phe

165 170 175
Val Glu Gly Ala Lys Asn Ala Ile Phe Lys Ala Gly Phe Asp Gly Val

180 185 190
Glu Ile His Gly Ala Asn Gly Tyr Leu Leu Asp Ala Phe Phe Arg Glu

195 200 205
Ser Ser Asn Lys Arg Gln Ser Gly Pro Tyr Ala Gly Thr Thr Ile Asp

210 215 220
Thr Arg Cys Gln Leu Ile Tyr Asp Val Thr Lys Ser Val Cys Asp Ala

225 230 235 240
Val Gly Ser Asp Arg Val Gly Leu Arg Ile Ser Pro Leu Asn Gly Val

245 250 255
His Gly Met Ile Asp Ser Asn Pro Glu Ala Leu Thr Lys His Leu Cys
260 265 270
Lys Lys Ile Glu Pro Leu Ser Leu Ala Tyr Leu His Tyr Leu Arg Gly
275 280 285
Asp Met Val Asn Gln Gln Ile Gly Asp Val Val Ala Trp Val Arg Gly
290 295 300
Ser Tyr Ser Gly Val Lys Ile Ser Asn Leu Arg Tyr Asp Phe Glu Glu

4/6
305 310 315 320
Ala Asp Gln Gln Ile Arg Glu Gly Lys Val Asp Ala Val Ala Phe Gly
325 330 335
Ala Lys Phe Ile Ala Asn Pro Asp Leu Val Glu Arg Ala Gln Gln Asn
340 345 350
Trp Pro Leu Asn Glu Pro Arg Pro Glu Thr Tyr Tyr Thr Arg Thr Ala
355 360 365
Val Gly Tyr Asn Asp Tyr Pro Thr Tyr Asn Lys
370 375

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 3

Asn Arg Ile Ile Met Ala Pro Leu Thr Arg
1 5 10

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Trypanosoma cruzi
<400> 4
Asp His Arg Ile Pro Val Tyr Phe Ala Ala
1 5 10

<210> 5
5/6

<211> 10
<212> PRT
<213> Trypanosoma cruzi
<400> 5
Ile Ser Asn Leu Arg Tyr Asp Phe Glu Glu
1 5 10

<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Trypanosoma cruzi
<400> 6
cggaattcat ggcgacgttc cctgaacttc
30
<210> 7

<211> 30
<212> ADN
<213> Trypanosoma cruzi
<400> 7
ccgctcgagt tattgttgt acgtcgggta 30
<210> 8
<211> 22
<212> ADN



<213> Trypanosoma cruzi

6/6

400> 8
atggcgacgt tccctgaact cc 22
<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Trypanosoma cruzi
<400> 9
ttattgttg tacgtcgggt a 21

PCT

特許性に関する国際予備報告（特許協力条約第二章）

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 664102	今後の手続きについては、様式PCT/IEPA/416を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO3/13043	国際出願日 (日.月.年) 10.10.2003	優先日 (日.月.年) 11.10.2002
国際特許分類(IPC) Int. Cl. C12N9/02, C12N15/53, C12Q1/68, C12Q1/26, C07K16/40, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/569		
出願人(氏名又は名称) 財団法人大阪バイオサイエンス研究所		

1. この報告書は、PCT35条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。 法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。	
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。	
3. この報告には次の附属物件も添付されている。 a ☐ 附属書類は全部で ページである。 ☐ 補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面の用紙(PCT規則70.16及び実施細則第607号参照) ☐ 第I欄4.及び補充欄に示したように、出願時における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した差替え用紙 b ☒ 電子媒体は全部で ディスク 1枚 (電子媒体の種類、数を示す)。 配列表に関する補充欄に示すように、コンピュータ読み取り可能な形式による配列表又は配列表に関連するテーブルを含む。(実施細則第802号参照)	
4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 ☒ 第I欄 国際予備審査報告の基礎 ☐ 第II欄 優先権 ☒ 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 ☐ 第IV欄 発明の単一性の欠如 ☒ 第V欄 PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 ☐ 第VI欄 ある種の引用文献 ☐ 第VII欄 国際出願の不備 ☐ 第VIII欄 国際出願に対する意見	

国際予備審査の請求書を受理した日 05.02.2004	国際予備審査報告を作成した日 20.05.2004		
名 及びあて先 日本国特許庁(IEPA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区麹町三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4N	3126

様式PCT/IEPA/409(表紙)(2004年1月)

第 I 欄 報告の基礎

1. この国際予備審査報告は、下記に示す場合を除くほか、国際出願言語を基礎とした。

- ☐ この報告は、_____ 語による翻訳文を基礎とした。
それは、次の目的で提出された翻訳文の言語である。
- ☐ PCT規則12.3及び23.1(b)にいう国際調査
- ☐ PCT規則12.4にいう国際公開
- ☐ PCT規則55.2又は55.3にいう国際予備審査

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書

第 _____ ページ、
第 _____ ページ*、
第 _____ ページ*、

出願時に提出されたもの

付けて国際予備審査機関が受理したもの

付けて国際予備審査機関が受理したもの

☐ 請求の範囲

第 _____ 項、
第 _____ 項*、
第 _____ 項*、
第 _____ 項*、

出願時に提出されたもの

PCT19条の規定に基づき補正されたもの

付けて国際予備審査機関が受理したもの

付けて国際予備審査機関が受理したもの

☐ 図面

第 _____ ページ/図、
第 _____ ページ/図*、
第 _____ ページ/図*、

出願時に提出されたもの

付けて国際予備審査機関が受理したもの

付けて国際予備審査機関が受理したもの

☒ 配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. ☐ 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図
- ☐ 配列表 (具体的に記載すること) _____
- ☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

4. ☐ この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図
- ☐ 配列表 (具体的に記載すること) _____
- ☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

* 4. に該当する場合、その用紙に "superseded" と記入されることがある。

第Ⅲ欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 8-10

理由:

- ☒ この国際出願又は請求の範囲 8-10 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

人の診断方法を含むものである。

- ☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

- ☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- ☒ 請求の範囲 8-10 について、国際調査報告が作成されていない。

- ☐ ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が、実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を、次の点で満たしていない。

書面による配列表が

- ☐ 提出されていない。
☐ 所定の基準を満たしていない。
☐ 提出されていない。
☐ 所定の基準を満たしていない。

コンピュータ読み取り可能な形式による配列表が

- ☐ コンピュータ読み取り可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表に関連するテーブルが、実施細則の附属書Cの2に定める技術的な要件を、次の点で満たしていない。

- ☐ 提出されていない。
☐ 所定の技術的な要件を満たしていない。

- ☐ 詳細については補充欄を参照すること。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-7	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-7	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-7	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : J. Exp. Med., 2000, Vol.192, No.9, pages 1327-37
文献2 : Science, 2001, Vol.294, pages 2317-2323

・請求の範囲1-7について

請求の範囲1-7に記載された発明は、国際調査報告で引用された上記文献1-2の何れにも記載されておらず、新規性及び進歩性を有する。

文献1-2には、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含む、クルーズトリパノソーマに由来するプロスタグランジンH2をプロスタグランジンH2αに変換する酵素活性を有するフラビン蛋白質は記載されておらず、また、当業者といえども容易に想到し得ないものである。

配列表に関する補充欄

第1欄2. の続き

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際予備報告を作成した。

- a. タイプ ☒ 配列表
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 書面
☒ コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる
☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された
☐ 出願後に、調査又は予備審査のために、この国際機関に提出された
☐ _____ 付けで、この国際予備審査機関が補正*として受理した

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

*第1欄4. に該当する場合、差替える配列表又は配列表に関連するテーブルに "superseded" と記入されることがある。

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）



出願人代理人 柯富怡 あて名 〒 540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所	標
--	---

PCT
国際予備審査機関の見解書
(法第13条)
[PCT規則66]

発送日
(日.月.年) 02.3.2004

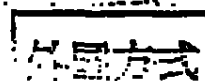
出願人又は代理人 の書類記号 664102	応答期間 上記発送日から 2 月以内
国際出願番号 PCT/JPO3/13043	国際出願日 (日.月.年) 10.10.2003
	優先日 (日.月.年) 11.10.2002
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C12N9/02, C12N15/53, C12Q1/68, C12Q1/26, C07K16/40, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/569	
出願人 (氏名又は名称) 財団法人大阪バイオサイエンス研究所	

- ☐ 国際調査機関の作成した見解書は、国際予備審査機関の見解書と ☐ みなされる。
☐ みなされない。
- この第 1 回目の見解書は、次の内容を含む。
 - ☒ 第I欄 見解の基礎
 - ☐ 第II欄 優先権
 - ☒ 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
 - ☐ 第IV欄 発明の単一性の欠如
 - ☒ 第V欄 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ 第VI欄 ある種の引用文献
 - ☐ 第VII欄 国際出願の不備
 - ☐ 第VIII欄 国際出願に対する意見
- 出願人は、この見解書に回答することが求められる。
いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に関合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(e)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限定されることに注意されたい。
どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正の形式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。
なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。
応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。
- 特許性に関する国際予備報告 (特許協力条約第2章) 作成の最終期限は、
PCT規則69.2の規定により 11.02.2005 である。

名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高瀬 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4N 3126
--	--	---------

様式PCT/IPEA/408 (表紙) (2004年1月)

(添付用紙の注意書きを 照)



第I欄 見解 基礎

1. この見解書は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎として作成された。

- ☐ この見解書は、_____ 語による翻訳文を基礎とした。
それは、次の目的で提出された翻訳文の言語である。
- ☐ PCT規則12.3及び23.1(b)にいう国際調査
- ☐ PCT規則12.4にいう国際公開
- ☐ PCT規則55.2又は55.3にいう国際予備審査

2. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書

第 _____ ページ、
第 _____ ページ、
第 _____ ページ、

出願時に提出されたもの

付けて国際予備審査機関が受理したもの

付けて国際予備審査機関が受理したもの

☐ 請求の範囲

第 _____ 項、
第 _____ 項、
第 _____ 項、
第 _____ 項、

出願時に提出されたもの

PCT19条の規定に基づき補正されたもの

付けて国際予備審査機関が受理したもの

付けて国際予備審査機関が受理したもの

☐ 図面

第 _____ ページ/図、出願時に提出されたもの
第 _____ ページ/図、
第 _____ ページ/図、

付けて国際予備審査機関が受理したもの

付けて国際予備審査機関が受理したもの

☒ 配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. ☐ 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図
- ☐ 配列表 (具体的に記載すること) _____
- ☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

4. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図
- ☐ 配列表 (具体的に記載すること) _____
- ☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

臨察出願全体

☒ 請求の範囲 8-10

☒ この国際出版又は請求の範囲 8-10 は、国際予備審査をすることを要しない
次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

人の診断方法を含むものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 _____ が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 8-10 . について、国際調査報告が作成されていない。

☐ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が、実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を、次の点で満たしていない。

書面による配列表が

コンピュータ読み取り可能な形式による配列表が

☐	提出されていない。
☐	所定の基準を満たしていない。
☐	提出されていない。
☐	所定の基準を満たしていない。

☐ コンピュータ読み取り可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表に関連するテーブルが、実施細則の附属Cの2に定める技術的要件を、次の点で満たしていない。

☐ 提出されていない。
☐ 所定の技術的な要件を満たしていない。

☐ 詳細については補充欄を参照すること。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性について 法第13条（PCT規則66.2(a)(ii)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 1-7	有
	請求の範囲	無
進歩性 (IS)	請求の範囲 1-7	有
	請求の範囲	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲 1-7	有
	請求の範囲	無

2. 文献及び説明

文献1 : J. Exp. Med., 2000, Vol.192, No.9, pages 1327-37
文献2 : Science, 2001, Vol.294, pages 2317-2323

・ 請求の範囲 1-7 について

請求の範囲 1-7 に記載された発明は、国際調査報告で引用された上記文献 1-2 の何れにも記載されておらず、新規性及び進歩性を有する。

文献 1-2 には、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む、クルーズトリパノソーマに由来するプロスタグランジン H2 をプロスタグランジン H2 α に還元する酵素活性を有するフラビン蛋白質は記載されておらず、また、当業者といえども容易に想到し得ないものである。

配列表に関する補充欄

第1欄2. の続き

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき見解書を作成した。

- a. タイプ ☒ 配列表
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 書面
☒ コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる
☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された
☐ 出願後に、調査又は予審査のために、この国際機関に提出された
☐ _____ 付けで、この国際予審査機関が補正として受理した

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

USUARIO RADICADOR

Indicación de que se solicita la concesión de una patente.
 Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.
 Descripción de la invención.
 Dibujos de ser estos pertinentes.
 Comprobante de Pago de las tasas establecidas.

() ()
 () ()
 () ()
 () ()

COMPLETA ()

INCOMPLETA () ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial
 Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.
 Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.
 Comprobante de pago de las tasas establecidas

() ()
 () ()
 () ()
 () ()

COMPLETA ()

INCOMPLETA () ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

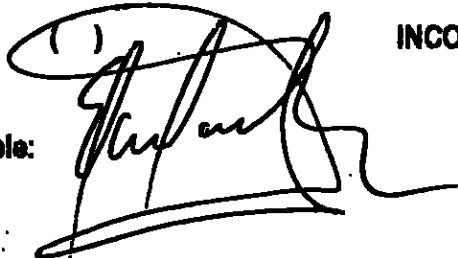
Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.
 Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.
 Representación gráfica del esquema de trazado
 Comprobante de pago de las tasas establecidas.

() ()
 () ()
 () ()
 () ()

COMPLETA ()

INCOMPLETA () ()

Firma Responsable:



Fecha:

Radicación : 05032136 00000000

Folios: 1/1

Fecha (GMD): 2005-04-11 15:40:26

Trámite : 011 ACT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folio 133

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor(a)
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

Oficio N° 13141

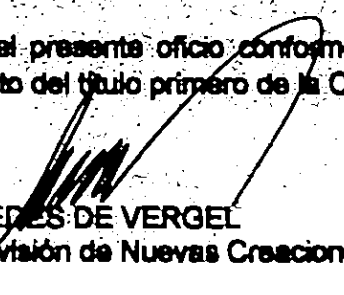
ASUNTO:	Radicación N°	05-32838
	Solicitud Internacional	PCT/JP2003/013043
	Fecha límite inicio fase nacional	11/05/2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 488 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:

- Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 38.2.b) del tratado PCT.
- 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. (Art. 26-k) Decisión 488.
- 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.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 488, 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.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 01 JUL 2005

202027

Carrera 13 No. 27-00 Pto 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@ic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia