



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

05-65336

54. TITULO

POLYPEPTIDOS RECOMBINANTES PARA DIAGNOSTICAR LA INFECCION

CON EL TRYPANOSOMA CRUZIE

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K 38/02, 601N 33/53

71. SOLICITANTE S

KIRCHHOFF, Louis V. y OTSU, Keiko.

DOMICILIO S

Iowa City, Iowa, Estados Unidos, respectivamente.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén.

22. BOGOTA, D.C.,


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación : 65065336 00000000

Folios: 99

Fecha (HH): 2005-07-01 17:02:16

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAR

Dependencia: 2820 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL 04-04-2005
SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

 Nombre: KIRCHHOFF, Louis V. y
OTSU, Kelko

 Dirección: 204 Lenxington Avenue,
Iowa City, Iowa 52248,
Estados Unidos de América, y
601 Normandy Drive,
Iowa City, Iowa 52248,
Estados Unidos de América,
respectivamente.

 Domicilio: Iowa City, Iowa, Estados Unidos
de América.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

 Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 38 11
Fax: 211 88 50
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

 1. Louis V. KIRCHHOFF
204 Lenxington Avenue,
Iowa City, Iowa 52248,
Estados Unidos de América

 2. Kelko OTSU
601 Normandy Drive,
Iowa City, Iowa 52248,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)

 Solicitud Internacional No. PCT/US2003/038458

 Fecha: 04 de Diciembre de 2003

 Publicación Internacional No. WO 2004/050852 A2

 Fecha: 17 de Junio de 2004

6

Título (54)
**POLIPÉPTIDOS RECOMBINANTES PARA DIAGNOSTICAR LA INFECCIÓN CON EL
TRYPANOSOMA CRUZI**

7

Clasificación Internacional (51) C12N G01N 33/53
A61K 38/02

8

Prioridad

 SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

04 de Diciembre de 2002

(31) Número de Solicitud

60/430.654

9

Comprobante de pago No.: 05 - 46.079
Fecha: 21 de Junio de 2005

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SIPDET/INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 85955336 00000000

Folios: 99

Fecha (AMD): 2005-07-01 17:02:16

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAL

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE**PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL 04-04-2005****SOLICITUD DE:****1**☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.**2****SOLICITANTE
(71)**Nombre: KIRCHHOFF, Louis V. y
OTSU, KelkoDirección: 204 Lenxington Avenue,
Iowa City, Iowa 52246,
Estados Unidos de América, y
601 Normandy Drive,
Iowa City, Iowa 52246,
Estados Unidos de América,
respectivamente.Domicilio: Iowa City, Iowa, Estados Unidos
de América.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número

3**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929**4****INVENTOR (ES)
(72)**1. Louis V. KIRCHHOFF
204 Lenxington Avenue,
Iowa City, Iowa 52246,
Estados Unidos de América2. Kelko OTSU
601 Normandy Drive,
Iowa City, Iowa 52246,
Estados Unidos de América**5****PCT (86)**Solicitud Internacional No. PCT/US2003/038458Fecha: 04 de Diciembre de 2003Publicación Internacional No. WO 2004/050852 A2Fecha: 17 de Junio de 2004**6****Título (54)****POLIPÉPTIDOS RECOMBINANTES PARA DIAGNOSTICAR LA INFECCIÓN CON EL
TRYPANOSOMA CRUZI****7****Clasificación Internacional (51)** C12N 601N33/53
A61K 38/02**8****Prioridad**SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

04 de Diciembre de 2002

(31) Número de Solicitud

60/430.654**9****Comprobante de pago No.:** 05 - 46.079**Fecha:** 21 de Junio de 2005

10

An xos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 443.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar 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.
- ☒ Otros: Listado de secuencias genéticas

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA: *Emilio Ferrero*

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 June 2004 (17.06.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/050852 A2

(51) International Patent Classification⁷: C12N
(21) International Application Number: PCT/US2003/038458
(22) International Filing Date: 4 December 2003 (04.12.2003)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 60430,654 4 December 2002 (04.12.2002) US

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KB, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (BW, GH, GM, KB, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicants and
(72) Inventors: KIRCHHOFF, Louis, V. [US/US]; 204 Lexington Avenue, Iowa City, IA 52246 (US). OTSU, Keiko [JP/US]; 601 Normandy Drive, Iowa City, IA 52246 (US).
(74) Agent: ROBINS, Eric; Stevens, Davis, Miller & Mosher LLP, 1615 L Street, NW, Suite 850, Washington, DC 20036-3622 (US).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: RECOMBINANT POLYPEPTIDES FOR DIAGNOSING INFECTION WITH *TRYPANOSOMA CRUZI*



(57) Abstract: Recombinant polypeptides are disclosed that are useful for diagnosing American trypanosomiasis, or Chagas disease, a disease caused by the infectious agent *Trypanosoma cruzi*. Preferably, DNA sequences encoding the recombinant proteins are placed in plasmid vectors to be expressed in an organism.

WO 2004/050852 A2

4

**RECOMBINANT POLYPEPTIDES FOR DIAGNOSING INFECTION WITH
TRYPANOSOMA CRUZI**

This application claims priority from U.S. Provisional Application No. 60/430,654, filed December 4, 2002, hereby incorporated by reference in its entirety.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0001] 1. Field of the invention

[0002] The present invention relates to recombinant polypeptides that are useful for diagnosing American trypanosomiasis, or Chagas disease. Chagas disease is caused by the infectious agent *Trypanosoma cruzi*. More particularly, the invention relates to specific combinations of recombinant *T. cruzi* polypeptides, synthesized using genetic engineering techniques, and to constructs and processes for producing the recombinant polypeptides, and to an assay and kit for detecting *T. cruzi* infection which employs the recombinant polypeptides.

[0003] 2. Background

[0004] Chagas disease is a zoonosis caused by the protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*. This organism is primarily transmitted through contact with its triatomine insect vectors, but transmission by transfusion of contaminated blood and congenital transmission also are important. Historically Chagas disease has been a public health problem in all of Latin America, with the exception of the Caribbean nations. The World Health Organization estimates that 16-18 million persons are chronically infected with *T. cruzi*, and that 45,000 deaths occur each year due to the illness. Infection with *T. cruzi* is life-long and specific drug treatment lacks efficacy and often causes serious side effects. Ten to thirty percent of *T. cruzi*-infected persons develop chronic symptomatic Chagas disease, and the burden of disability and mortality in the endemic countries is enormous.

[0005] An estimated 80,000 to 100,000 *T. cruzi*-infected persons now live in the United States. These immigrants pose a risk for transfusion-associated transmission of the

5

parasite here and in other countries to which Latin Americans have emigrated. Eight such cases have been reported in the United States, Canada, and Europe, all of which occurred in immunosuppressed patients in whom acute *T. cruzi* infection was diagnosed because of the fulminant course of the illness. Most transfusions are given to immunocompetent patients in whom acute Chagas disease would be a mild illness, and thus it is reasonable to assume that many other undetected instances of transfusion-associated transmission of *T. cruzi* have occurred in the United States and other industrialized nations. The question of whether blood donated in the United States should be screened serologically for antibodies to *T. cruzi* has been considered for at least a decade by both public and private entities involved in blood banking. A panel of experts convened in early 2000 by the American Red Cross to consider this issue recommended unanimously that our blood supply be screened serologically. Implementation of such a recommendation, however, is not an option currently because no test for *T. cruzi* infection has been cleared by the FDA for screening donated blood.

[0006] Diagnosis of *T. cruzi* infection presents problems. Demographic and clinical data are suggestive at best. Parasitologic tests, e.g., xenodiasis, hemoculture and PCR are insensitive. Other serologic tests are generally insensitive and lack specificity, as false positive reactions often occur with specimens from patients having infectious diseases, such as leishmaniasis, syphilis, or malaria; autoimmune diseases; and other parasitic and non-parasitic illnesses.

[0007] Such conventional tests include indirect immunofluorescence (IIF), indirect hemagglutination (IHA), and complement fixation (CF) tests, as well as enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA or EIA). Due to the lack of sensitivity and specificity of the three commonly used assays, when a sample has a positive result from any, the blood must be discarded. Table I shows that in a major Brazilian blood bank (Hemocentro, São Paulo, Brazil), up to 3.43% of blood donations fall into this category.

B

<u>IIF</u>	<u>IHA</u>	<u>CF</u>	<u>% w/ Results</u>
+	+	+	0.68%
+	-	+	0.71%
+	+	-	
-	+	+	
+	-	-	2.04%
-	+	-	
-	-	+	
TOTAL:			3.43%

TABLE I

[0008] Commercially available ELISAs include lysate-based tests such as the Chagas Enzyme Immunoassay (EIA), available from Abbott Laboratories of Abbott Park, Illinois (the subject of FDA 510(k) Premarket Notification No. K933716, herein incorporated by reference in its entirety); the Chagas' IgG ELISA, available from Meridian Bioscience, Inc. of Cincinnati, Ohio, and its predecessor, Gull Laboratories (the subject of FDA 510(k) Premarket Notification No. K911233, herein incorporated by reference in its entirety); and the Chagas' kit (EIA method), available from Hemagen Diagnostics, Inc., of Waltham, Massachusetts (the subject of FDA 510(k) Premarket Notification No. K930272, herein incorporated by reference in its entirety). However, because these tests have less than optimal sensitivities and specificities, their use for screening donated blood would fail to detect some *T. cruzi*-infected units and also would cause substantial numbers of otherwise usable units to be discarded needlessly.

[0009] One of the present inventors has previously developed a radioimmune precipitation assay (RIPA), described in Kirchhoff LV, Gam AA, Gusmao RD, Goldsmith RS, Rezende JM, Rassi A. "Increased specificity of serodiagnosis of Chagas' disease by detection of antibody to the 72 and 90 kDa glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*." J Infect Dis 1987;155:561-564, herein incorporated by reference in its entirety. This test is considered the benchmark against which other tests are measured, and it is the only current option for confirmatory testing in the United States. Unfortunately, the RIPA costs \$175 per assay, and at that price, screening the approximately 13 million units of blood donated each year would cost over \$2 billion.

[0010] Therefore, the present inventors have further developed recombinant assays for detection of *T. cruzi* infection. A typical recombinant polypeptide and method for assaying is described by them in U.S. Patent No. 5,876,734, No. 6,228,601, and PCT Publication No. WO 95/25797, each of which is herein incorporated by reference in its entirety. Such assays for *T. cruzi* infection based on recombinant antigens, in contrast to those utilizing native antigens (e.g., the conventional lysate-based assays), as discussed above, will be more accurate, i.e., the sensitivity and specificity will be higher.

[0011] Furthermore, the recombinant assays of the invention present manufacturing advantages over the materials for the RIPA and conventional tests. Once the molecular biology has been completed, the recombinant antigens are produced in *Escherichia coli*, thus eliminating completely any biohazard associated with growing the parasites in liquid culture. This is a substantive advantage, as many cases of laboratory-acquired *T. cruzi* infection have been reported. Additionally, recombinant antigens produced in *E. coli* are much easier to purify, quantitate, and standardize than antigen lysates produced in liquid cultures of parasites, thus facilitating the manufacture of a consistent product and simplifying compliance with governmental regulations. A final advantage lies in the fact that several of the recombinant proteins presented in this application are comprised of two to four distinct protein segments derived from separate *T. cruzi* genes. This use of hybrid recombinant proteins also facilitates manufacture of an assay in that several antigenically distinct proteins are obtained in a single purification, quantitation, and standardization run.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0012] The present invention utilizes recombinant proteins for detecting *T. cruzi* infected blood. The invention utilizes specific polypeptide sequences that correspond to fusion proteins FP3, FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9 and FP10 as described below. Isolated polynucleotides that encode the inventive polypeptides according to the present invention are also utilized, as are cells transformed with a recombinant plasmid that expresses a polypeptide according to the invention. The present invention is similar to that which is described in U.S. Patent No. 5,876,734, herein incorporated by reference in its entirety. However, the present invention replaces the proteins in the process with the recombinant

proteins of this invention to achieve similar or superior results.

[0013] The present invention also provides a method for detecting the presence of antibodies to *T. cruzi* in an individual, comprising the steps of contacting a putative anti-*T. cruzi* antibody-containing sample from an individual with a polypeptide according to the invention that is typically attached or conjugated to a carrier molecule or attached or conjugated to a solid phase; allowing anti-*T. cruzi* and other antibodies in said sample to bind to said polypeptide; washing away unbound anti-*T. cruzi* antibodies; and adding a compound that enables detection of the anti-*T. cruzi* antibodies which are specifically bound to the polypeptide. The compound that enables detection of the anti-*T. cruzi* antibodies may be selected from the group consisting of a colorimetric agent, a fluorescent agent, a chemiluminescent agent and a radionucleotide.

[0014] Also provided in accordance with the present invention is a kit for diagnosing the presence of anti-*T. cruzi* antibodies in a sample, comprising a container in which a polypeptide according to the invention is attached or conjugated to a carrier molecule or attached or conjugated to a solid phase; and directions for carrying out the method according to the invention. The kit additionally may comprise a container of a compound that binds to anti-*T. cruzi* antibodies and that renders said antibodies detectable.

[0015] Other objects, features and advantages of the present invention will become apparent from the following detailed description. It should be understood, however, that the detailed description and the specific examples, while indicating preferred embodiments of the invention, are given by way of illustration only, since various changes and modifications within the spirit and scope of the invention will become apparent to those skilled in the art from this detailed description.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0016] Fig. 1 is a description of the prior art.

[0017] Fig. 1a-1h are schematic representations of the recombinant proteins utilized in

the invention.

[0018] Fig. 2 is a bar graph showing reactivity of various blood specimens with recombinant proteins used alone or in combination as target antigens in ELISAs.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0019] Figures 1a-1h represent the recombinant proteins of the invention, with the various letters indicating known protein sequences, as follows. The Figs. are schematic diagrams of the recombinant *T. cruzi* proteins, comprised of segments A through L. Solid segments (A, C, D, F, H, I, and K) represent nonrepetitive proteins having amino acid sequences that are unrelated to each other. Saw-tooth segments (B, E, G, J, and L) represent repetitive proteins having amino acid sequences that are unrelated to each other and unrelated to those of the nonrepetitive proteins. The relative sizes and numbers of repeats in the repetitive proteins are roughly represented in the Figs. The sizes and shapes of the nonrepetitive segments bear no relation to the actual proteins.

[0020] The following information refers to Figures 1 and 1a-1h in which the recombinant proteins Ag15, FP3, FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9 and FP10 are depicted schematically. These proteins are derived from *T. cruzi*, the protozoan parasite that causes Chagas disease, and are formed from of proteins A through L as indicated, and defined herein. There are no substantive amino acid similarities among proteins A through L. Similarly there are no substantive DNA sequence similarities among the segments that encode proteins A through L. The *T. cruzi* DNA sequences that encode proteins A through L were cloned in combination into pGEX and pET plasmid vectors, such as pET-32a. Strains of *Escherichia coli* were transfected with the recombinant vectors bearing the *T. cruzi* DNA sequences, and the bacteria were incubated in liquid culture under conditions favoring synthesis of the recombinant proteins. The latter proteins were subsequently affinity-purified and then used as target antigens in ELISAs. ELISAs in which proteins Ag15, FP3, FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9, and FP10, alone or in combination are employed as target antigens are useful as sensitive and specific detectors of anti-*T. cruzi*

antibodies in blood specimens obtained from persons who are chronically infected with this parasite. The detection of such antibodies is the primary means of identifying persons who are chronically infected with *T. cruzi*.

[0021] The following paragraphs contain information relating to the naming, localization, and function of proteins A through L, as well as the corresponding GenBank accession numbers of the sequences to which they are related and relevant publications.

[0022] It should be noted that the *T. cruzi* gene segments that encode protein segments A through L generally are shortened versions of the native coding regions. In this context, the constructs that encode single segments (i.e., FP5 and FP9), as well as all the others that encode more than one segment, are all unique, because, even if the individual components from which the various recombinant proteins of this invention are known, the segments of the invention have not been combined previously as described herein.

[0023] Protein AB. This hybrid recombinant protein, also designated Ag15 [SEQ ID NO. 2] in Figure 1, is derived from the TCR27 gene of *T. cruzi* [SEQ ID NO. 1]. Protein A is the amino terminal nonrepetitive portion of the TCR27 protein, and Protein B is comprised of approximately 18 of the 14 amino acid repeats that make up the central portion of the TCR27 protein. The two native TCR27 genes sequenced contained approximately 69 and 105 of the 14-amino acid repeats.

[0024] Nucleotide sequence data that include the Ag15 DNA sequence were deposited with GenBank and EMBL databases by Keiko Otsu, John B. Donelson, and Louis V. Kirchhoff with the accession number L04603 and are described in U.S. Patent No. 5,876,734 and No. 6,228,601, issued to Louis V. Kirchhoff and Keiko Otsu (each of which is herein incorporated by reference in its entirety). These references also present DNA and inferred protein sequences that include the Ag15 DNA and inferred protein sequences. The Ag15 DNA and inferred protein sequences are additionally presented in Otsu K, Donelson JE, Kirchhoff LV. "Interruption of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a protein containing 14-amino acid repeats by targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene." *Mol Biochem Parasitol* 1993;57:317-330, herein incorporated by reference in its entirety.

[0025] Protein C. This is a calcium binding protein of *T. cruzi*, initially called 1F8 and later designated the flagellar calcium binding protein (FCaBP) [SEQ ID NO 4]. The accession number of the original 1F8 DNA sequence [SEQ ID NO 3] deposited in GenBank is K03278. The Protein C DNA and inferred protein sequences are presented in Gonzalez A, Lerner TJ, Huecas M, Sosa-Pineda B, Nogueira N, Lizardi PM. "Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*." Nucleic Acids Res 1985;13(16):5789-804, herein incorporated by reference in its entirety.

[0026] Fig. 1a shows a first protein (FP3) [SEQ ID NO. 22] in accordance with the invention. Specifically, FP3 corresponds essentially to the combination of Ag15 (Fig. 1), and by Protein C. The DNA sequence encoding FP3 [SEQ ID NO 21], also essentially corresponds to the sequences coding for Ag15 and Protein C.

[0027] Protein D. This is the protein core of a surface glycoprotein of *T. cruzi* that is referred to as GP72 [SEQ ID NO 6]. The accession number of the original gp72 DNA sequence [SEQ ID NO 5] deposited in GenBank is M65021. The Protein D DNA and inferred protein sequences are presented in Cooper R, Inverso JA, Espinosa M, Nogueira N, Cross GA. "Characterization of a candidate gene for GP72, an insect stage-specific antigen of *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol 1991;49(1):45-59, herein incorporated by reference in its entirety.

[0028] Fig. 1b shows a second protein (FP4) [SEQ ID NO 8] in accordance with the invention. The DNA sequence [SEQ ID NO 7] that encodes Protein DABC which is a single continuous coding region, essentially corresponds to the DNA sequences from which it was constructed.

[0029] Protein E. This is a segment of the flagellar repetitive protein (FRA) [SEQ ID NO 10] of *T. cruzi* comprised of approximately nine repeats consisting of 68 amino acids each, shown as Fig. 1c (FP5). The accession number of the original Protein E DNA sequence [SEQ ID NO 9] deposited in GenBank is J04015. The Protein E DNA and inferred protein sequences are presented in Lafaille JJ, Lins J, Krieger MA, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S. "Structure and expression of two *Trypanosoma*

cruzi genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes." *Mol Biochem Parasitol* 1989; 35(2):127-136, herein incorporated by reference in its entirety.

[0030] Protein FGH. This is a protein [SEQ ID NO 12] encoded by a modified version of the *T. cruzi* TCR39 gene that was artificially constructed [SEQ ID NO 11], shown as Fig. 1e (FP7). The modification entailed reducing the length of the central portion of the TCR39 gene that encodes the 12-amino acid repeats. Protein F is the amino terminal nonrepetitive segment of the TCR39 protein. Protein G is comprised of approximately 13 of the 12-amino acid repeats that make up the central portion of the TCR39 protein. Protein H is the carboxy terminal nonrepetitive segment of the TCR39 protein. The accession number of the original, i.e., the unmodified, Protein FGH DNA sequence deposited in GenBank is U15616. The TCR39 DNA and inferred protein sequences, which include the entire Protein FGH sequences, are presented in Gruber A, Zingales B. "Trypanosoma cruzi: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease." *Exp Parasitol* 1993;76(1):1-12, herein incorporated by reference in its entirety.

[0031] Fig. 1d shows another hybrid recombinant protein (FP6, Protein FGHE) [SEQ ID NO 14] in accordance with the invention. The DNA sequence that encodes Protein FGHE [SEQ ID NO 13], which is a single continuous coding region, essentially corresponds to the DNA sequences from which it was constructed.

[0032] Protein IJK. This is a protein [SEQ ID NO 16] encoded by a modified version of the *T. cruzi* shed acute phase antigen (SAPA) gene that was artificially constructed [SEQ ID NO 15], as shown in Fig. 1f (FP8). The modification entailed reducing the length of the central portion of the SAPA gene that consists of 12-amino acid repeats. Protein I is the amino terminal nonrepetitive segment of the SAPA protein. Protein J is comprised of approximately nine of the 12-amino acid repeats that make up the central portion of the SAPA protein. Protein K is the carboxy terminal nonrepetitive segment of the SAPA protein. The accession number of the original, i.e., the unmodified, Protein IJK DNA sequence deposited in Gen Bank is J03985. The SAPA DNA and protein sequences, which include the entire Protein IJK sequences, are presented in Affranchino JL,

Pollevick GD, Frasch ACC. "The expression of the major shed *Trypanosoma cruzi* antigen results from the developmentally-regulated transcription of a small gene family." FEBS Lett 1991;280:316-320, herein incorporated by reference in its entirety.

[0033] Protein L. This is a microtubule-associated repetitive protein (MAP) [SEQ ID NO 18] of *T. cruzi* that is comprised of approximately five repeats consisting of 38 amino acids each, as depicted in Fig. 1g (FP9). The accession number of the original Protein L DNA sequence [SEQ ID NO 17] deposited in GenBank is S68286. The Protein L DNA and inferred protein sequences are presented in Kerner N, Liegeard P, Levin MJ, Hontebeyrie-Joskowicz M. "Trypanosoma cruzi: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton." Experimental Parasitology 1991;73(4):451-459, herein incorporated by reference in its entirety.

[0034] Fig. 1h shows another hybrid recombinant protein (FP10, Protein IJL) [SEQ ID NO 20] in accordance with the invention. The DNA sequence that encodes Protein IJL [SEQ ID NO 19], which is a single continuous coding region, essentially corresponds to the DNA sequences from which it was constructed.

[0035] Additionally, combinations of the various recombinant proteins depicted in the Figs. may be used. While it is possible to combine one or more of the recombinant proteins to form longer recombinant proteins, typically more than one recombinant protein is used simultaneously. For example, simultaneous uses of FP4 and FP5, FP5 and FP6, as well as FP4 and FP6, and combinations using more than two recombinant proteins (e.g., FP4, FP6 and FP10) are considered within the scope of the present invention. It is believed that the sensitivity and specificity of the assays according to the invention are sufficient to meet FDA standards for screening the blood supply of the United States.

[0036] Additionally, as described in U.S. Patent No. 6,228,601 (herein incorporated by reference in its entirety), polypeptides need not correspond exactly over their entire lengths to be considered within the scope of the invention. For example, a wide variety of polypeptides which contain at least one epitope embodied in the polypeptides of the invention can be used in accordance with the present invention. Based on the nucleotide

14

sequences, polypeptide molecules also can be produced (1) that include sequence variations, relative to the naturally-occurring sequences, (2) that have one or more amino acids truncated from the naturally-occurring sequences and variations thereof, or (3) that contain the naturally-occurring sequences and variations thereof as part of a longer sequence.

[0037] In this description, polypeptide molecules in categories (1), (2) and (3) are said to "correspond" to the amino acid sequences of the recombinant proteins of the invention. Such polypeptides also are referred to as "variants." The category of variants within the present invention includes, for example, fragments and muteins of proteins A through L, as well as larger molecules that consist essentially at least one protein sequence A through L, alone or in combination with other proteins A to L.

[0038] In this regard, a molecule that "consists essentially of" protein A to L, alone or in combination with any other proteins A to L, is one that is immunoreactive with samples from persons infected with *T. cruzi*, but that does not react with samples from patients with leishmaniasis, schistosomiasis, and other parasitic and infectious diseases, with samples from patients with autoimmune disorders and other illnesses, and with specimens from normal persons.

[0039] A "mutein" is a polypeptide that is homologous to the protein to which it corresponds, and that retains the basic functional attribute--the ability to react selectively with samples from persons infected with *T. cruzi*--of the corresponding region. For purposes of this description, "homology" between two sequences connotes a likeness short of identity indicative of a derivation of the first sequence from the second. In particular, a polypeptide is "homologous" to the corresponding protein if a comparison of amino acid sequences between the polypeptide and the corresponding region reveals an identity of greater than 40%, preferably greater than 50% and more preferably 70%. Such sequence comparisons can be performed via known algorithms, such as those described in Pearson WR, Lipman DJ. "Improved tools for biological sequence comparison." Proc Natl Acad Sci USA 1988;85(8):2444-2448, herein incorporated by reference in its entirety, which are readily implemented by computer.

[0040] A fragment of a protein of the invention is a molecule in which one or more amino acids are truncated from that protein. Muteins and fragments can be produced, in accordance with the present invention, by known de novo synthesis techniques.

[0041] Also exemplary of variants within the present invention are molecules that are longer than a protein of the invention, but that contain the region or a mutein thereof within the longer sequence. For example, a variant may include a further fusion partner in addition to the protein of the invention. Such a fusion partner may allow easier purification of recombinantly-produced polypeptides. For example, use of a glutathione-S-transferase (26 kilodaltons, GST) fusion partner allows purification of recombinant polypeptides on glutathione agarose beads.

[0042] The portion of the sequence of a such molecule other than that portion of the sequence corresponding to the region may or may not be homologous to the sequence of a protein of the invention.

[0043] It will be appreciated that polypeptides shorter than the corresponding protein of the invention but that retain the ability to react selectively with samples from persons infected with *T. cruzi* are suitable for use in the present invention. Thus, variants may be of the same length, longer than or shorter than the protein of the invention, and also include sequences in which there are amino acid substitutions of the parent sequence. These variants must retain the ability to react selectively with samples from persons infected with *T. cruzi*.

[0044] In one embodiment, the assay of the invention uses FP4 as target antigen. Table II compares the results obtained by testing 45 pre-screened Argentinean specimens in an

		RIPA	
		+	-
FP4 ELISA	+	9	0
	-	0	36

TABLE II
FP4 ELISA with those obtained by RIPA testing.

[0045] The data in Table II show that in this group of specimens, the sensitivity and specificity of the FP4 ELISA were both 100%

[0046] Similarly, the performance of an FP4+FP6 ELISA in comparison to RIPA was

		RIPA	
		+	-
FP4+ FP6 ELISA	+	10	1
	-	0	78

TABLE III

assessed by testing 89 pre-selected Guatemalan specimens.

[0047] The data shown in Table III indicate that in this group of samples, the sensitivity of the FP4+FP6 ELISA was 100% and the specificity was 98.7%.

[0048] As shown in Fig. 2, in a FP4+FP6 ELISA, performed using standard procedures, a group of previously characterized RIPA-positive samples from several Chagas-endemic countries gave a mean reactivity (absorbance) of 2.99. Thus FP4+FP6 is the preferred embodiment among the recombinant proteins tested alone and in combination in that experiment.

[0049] It should be apparent that embodiments other than those specifically described above may come within the spirit and scope of the present invention, such as recombinant proteins comprised of different combinations and/or spatial arrangements of proteins A to L. Hence, the present invention is not limited by the above description.

We claim:

1. A recombinant plasmid vector comprising a DNA sequence which codes for a recombinant polypeptide corresponding to a polypeptide selected from the group consisting of FP3 [SEQ ID NO 22], FP4 [SEQ ID NO 8], FP5 [SEQ ID NO 10], FP6 [SEQ ID NO 14], FP7 [SEQ ID NO 12], FP8 [SEQ ID NO 16], FP9 [SEQ ID NO 18] and FP10 [SEQ ID NO 20].
2. The plasmid vector of claim 1, wherein the plasmid vector is selected from the group consisting of pGEX and pET plasmid vectors.
3. The plasmid vector of claim 2, wherein the plasmid vector is pET-32a.
4. The plasmid vector of claim 1, wherein the DNA sequence comprises one selected from the group consisting of SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 17, and SEQ ID NO 19.
4. An organism transfected with the plasmid vector of claim 1.
5. The organism of claim 4, wherein the organism is *Escherichia coli*.
6. A recombinant polypeptide comprising a sequence corresponding to one of FP3, FP4, FP6, FP7, FP8 and FP10.
7. A kit comprising:
a first recombinant polypeptide wherein the first recombinant polypeptide is the recombinant polypeptide of claim 6, and
a second recombinant polypeptide.
8. The kit of claim 7, wherein the second polypeptide comprises a sequence corresponding to one selected from the group consisting of Ag15 [SEQ ID NO 2], FP3,

FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9 and FP10, wherein the first recombinant polypeptide is different from the second recombinant polypeptide.

9. The kit of claim 7, wherein the first recombinant polypeptide is FP4 and the second recombinant polypeptide is FP6.

10. The kit of claim 7, further comprising a third recombinant polypeptide selected from the group consisting of Ag15, FP3, FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9 and FP10, wherein the first recombinant polypeptide, the second recombinant polypeptide and the third recombinant polypeptide are different.

11. The kit of claim 10, wherein the first recombinant polypeptide corresponds to FP4, the second recombinant polypeptide corresponds to FP6 and the third polypeptide corresponds to FP10.

12. A method of detecting the presence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in a sample from a subject, comprising:

(A) contacting the sample with a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of FP3, FP4, FP6, FP7, FP8 and FP10 or an immunoreactive fragment thereof, and

(B) detecting a specific binding interaction with an antibody in said sample, wherein the binding interaction comprises a specific binding between antibody in the sample and an epitope contained within the amino acid sequence set forth in FP3, FP4, FP6, FP7, FP8 and FP10 and wherein said specific binding interaction indicates past or present infection with *Trypanosoma cruzi*.

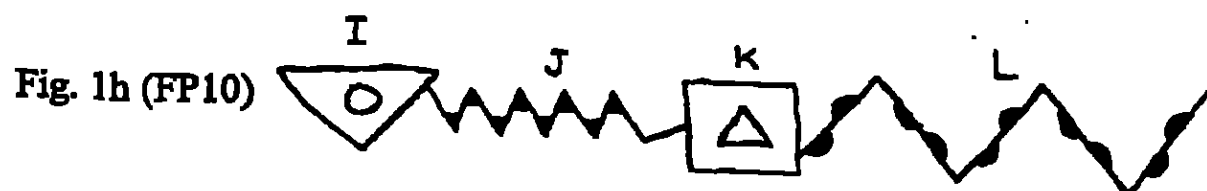
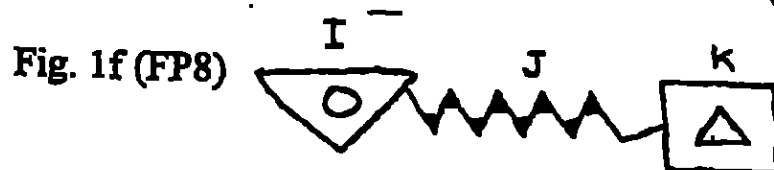
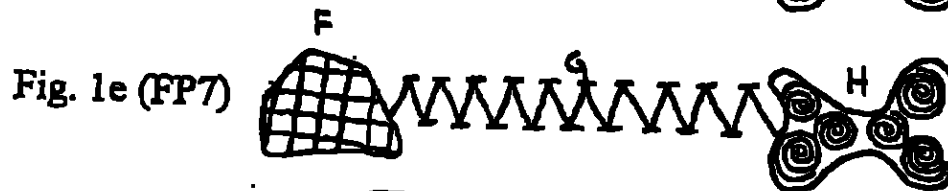
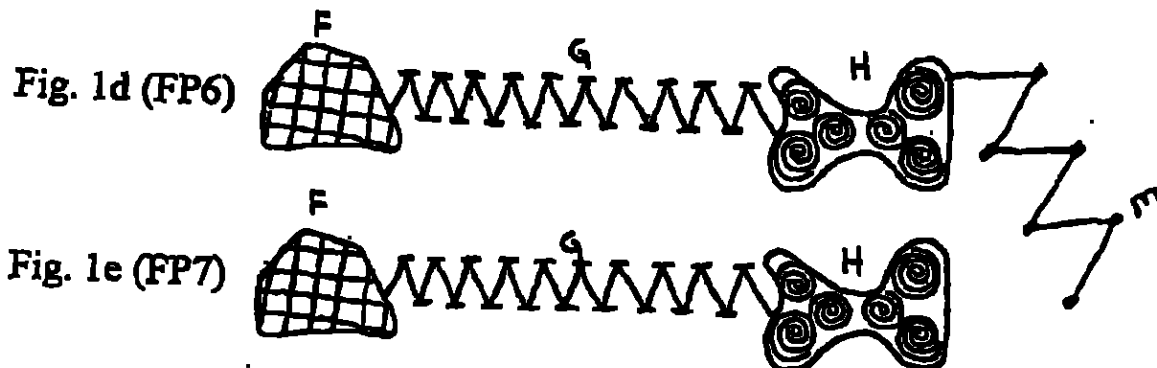
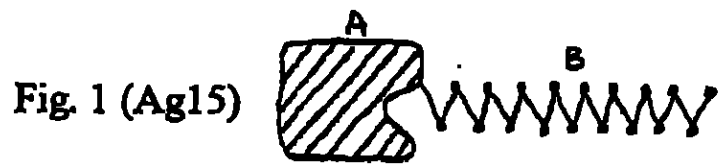
13. The method of claim 12, wherein the polypeptide of step A is immobilized on a carrier molecule or a solid phase.

14. The method of claim 12, wherein the polypeptide of step A has a sequence obtained from a strain or clone of *Trypanosoma cruzi*.

15. The method of claim 12, wherein the polypeptide has had one or more amino acids truncated.

16. The method of claim 12, wherein the step of detecting anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies bound to the immobilized polypeptide is carried out by adding at least one compound that detects the antibodies.

17. The method of claim 16, wherein the at least one compound that enables detection of the anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies is selected from the group consisting of a colorimetric agent, a fluorescent agent, a chemiluminescent agent and a radionucleotide.



2

22

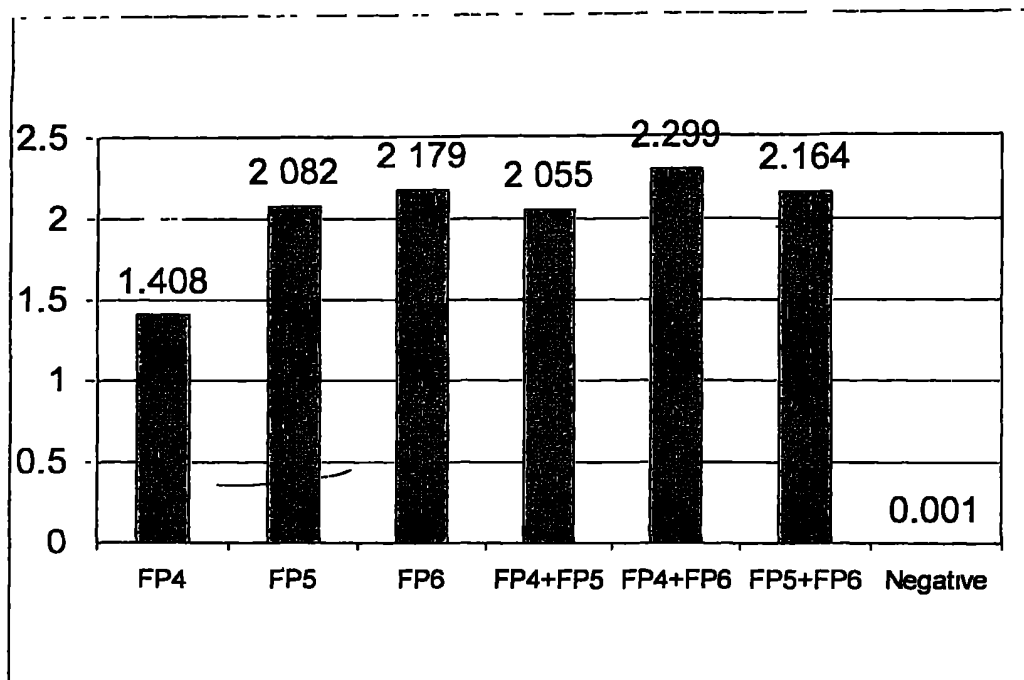


FIG 2

2

SEQUENCE LISTING

<110> KIRCHHOFF, LOUIS V
KEIKO, OTSU

<120> RECOMBINANT POLYPEPTIDES FOR DIAGNOSING INFECTION WITH
TRYPANOSOMA CRUZI

<130> PNL21311A

<150> US 60/430,654

<151> 2002-04-02

<160> 50

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1521

<212> DNA

<213> T: CRUZI

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1521)

<400> 1

tat ggc ccg agc tgt ggt gct tga gga tgg agc gct tta cgt ggc gga	48
Tyr Gly Pro Ser Cys Gly Ala Gly Trp Ser Ala Leu Arg Gly Gly	
1 5 10 15	

caa tgc caa caa cct cgt tgc aga aat ctc caa tgg cgt tgt cac ttc	96
Gln Cys Gln Gln Pro Arg Ser Arg Asn Leu Gln Trp Arg Cys His Phe	
20 25 30	

gtt tat tac gga agg act gct ggg ccc atc gta cat caa acc gta cag	144
Val Tyr Tyr Gly Arg Thr Ala Gly Pro Ile Val His Gln Thr Val Gln	
35 40 45	

ccg tac aaa tgg cgc tca tga ctt gtt tgt gtc gga cac ggg caa atc	192
Pro Tyr Lys Trp Arg Ser Leu Val Cys Val Gly His Gly Gln Ile	
50 55 60	

acg cat cat ttt tgc ccc acc tca gaa aaa aac gtt cat cac agt gtt	240
Thr His His Phe Cys Pro Thr Ser Glu Lys Asn Val His His Ser Val	
65 70 75	

tat aac agg att cca gcc gga tgt tct tca aat tag cga gaa gag tcg	288
Tyr Asn Arg Ile Pro Ala Gly Cys Ser Ser Asn Arg Glu Glu Ser	
80 85 90	

ttt gat gtt tgc cat ctg caa ttc cac gaa aat tct tgc gat taa tat	336
Phe Asp Val Cys His Leu Gln Phe His Glu Asn Ser Cys Asp Tyr	
95 100 105	

gca ggg agc cac aac ccc gaa gga gta ctg gca agt tgg aaa tgc gga	384
Ala Gly Ser His Asn Pro Glu Gly Val Leu Ala Ser Trp Lys Cys Gly	
110 115 120	

WO 2004/050852

PCT/US2003/038458

ctg	cat	ggg	cta	tca	gag	ttc	cct	cat	gct	cac	gac	cga	gga	gga	taa	432
Leu	His	Gly	Leu	Ser	Glu	Phe	Pro	His	Ala	His	Asp	Arg	Gly	Gly		
125					130					135						
act	cct	cta	cta	cgg	cat	att	aaa	tgg	aac	ccc	atc	cat	cat	gtc	ttt	480
Thr	Pro	Leu	Leu	Arg	His	Ile	Lys	Trp	Asn	Pro	Ile	His	His	Val	Phe	
140					145					150					155	
acc	cgc	cac	caa	aac	gaa	gac	gga	agc	acc	cag	aat	ttg	ccc	gga	tgt	528
Thr	Arg	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Gly	Ser	Thr	Gln	Asn	Leu	Pro	Gly	Cys	
				160					165					170		
gtt	gtt	gca	gtg	gcc	aca	tgg	gcc	cat	tgt	ttc	gct	tgt	gaa	tat	taa	576
Val	Val	Ala	Val	Ala	Thr	Trp	Ala	His	Cys	Phe	Ala	Cys	Glu	Tyr		
			175					180					185			
caa	aca	tgc	att	tta	cgt	tgt	tac	cgc	ctc	caa	tgt	ata	cat	tgt	aca	624
Gln	Thr	Cys	Ile	Leu	Arg	Cys	Tyr	Arg	Leu	Gln	Cys	Ile	His	Cys	Thr	
			190					195					200			
tga	tgg	ctc	gta	tca	tcc	gac	tgg	atc	cat	ggc	cca	gct	cca	aca	ggc	672
	Trp	Leu	Val	Ser	Ser	Asp	Trp	Ile	His	Gly	Pro	Ala	Pro	Thr	Gly	
			205					210					215			
aga	aaa	taa	tat	cac	taa	ttc	caa	aaa	aga	aat	gac	aaa	gct	acg	aga	720
Arg	Lys		Tyr	His		Phe	Gln	Lys	Arg	Asn	Asp	Lys	Ala	Thr	Arg	
			220						225					230		
aaa	agt	gaa	aaa	ggc	cga	gaa	aga	aaa	att	gga	cgc	cat	taa	ccg	ggc	768
Lys	Ser	Glu	Lys	Gly	Arg	Glu	Arg	Lys	Ile	Gly	Arg	His		Pro	Gly	
			235					240						245		
aac	caa	gct	gga	aga	gga	acg	aaa	cca	agc	gta	caa	agc	agc	aca	caa	816
Asn	Gln	Ala	Gly	Arg	Gly	Thr	Lys	Pro	Ser	Val	Gln	Ser	Ser	Thr	Gln	
			250					255					260			
ggc	aga	gga	gga	aaa	ggc	taa	aac	att	tca	acg	cct	tat	aac	att	tga	864
Gly	Arg	Gly	Gly	Lys	Gly		Asn	Ile	Ser	Thr	Pro	Tyr	Asn	Ile		
			265					270					275			
gtc	gga	aaa	tat	taa	ctt	aaa	gaa	aag	gcc	aaa	tga	cgc	agt	ttc	aaa	912
Val	Gly	Lys	Tyr		Leu	Lys	Glu	Lys	Ala	Lys		Arg	Ser	Phe	Lys	
			280						285						290	
tcg	gga	taa	gaa	aaa	aaa	ttc	tga	aac	cgc	aaa	aac	tga	cga	agt	aga	960
Ser	Gly		Glu	Lys	Lys	Phe		Asn	Arg	Lys	Asn		Arg	Ser	Arg	
					295						300					
gaa	aca	gag	ggc	ggc	tga	ggc	tgc	caa	ggc	cgt	gga	gac	gga	gaa	gca	1008
Glu	Thr	Glu	Gly	Gly		Gly	Cys	Gln	Gly	Arg	Gly	Asp	Gly	Glu	Ala	
			305				310					315				
gag	ggc	agc	tga	ggc	cac	gaa	ggt	tgc	cga	agc	gga	gaa	gcg	gaa	ggc	1056
Glu	Gly	Ser		Gly	His	Glu	Gly	Cys	Arg	Ser	Gly	Glu	Ala	Glu	Gly	
			320				325					330				
agc	tga	ggc	cgc	caa	ggc	cgt	gga	gac	gga	gaa	gca	gag	ggc	agc	tga	1104
Ser		Gly	Arg	Gln	Gly	Arg	Gly	Asp	Gly	Glu	Ala	Glu	Gly	Ser		
			335				340					345				

24

agc cac gaa ggt tgc cga agc gga gaa gca gaa ggc agc tga ggc cgc 1152
Ser His Glu Gly Cys Arg Ser Gly Glu Ala Glu Gly Ser Gly Arg
350 355 360

caa ggc cgt gga gac gga gaa gca gag ggc agc tga agc cac gaa ggt 1200
Gln Gly Arg Gly Asp Gly Glu Ala Glu Gly Ser Ser His Glu Gly
365 370 375

tgc cga agc gga gaa gca gag ggc agc tga agc cat gaa ggt tgc cga 1248
Cys Arg Ser Gly Glu Ala Glu Gly Ser Ser His Glu Gly Cys Arg
380 385 390

agc gga gaa gca gaa ggc agc tga ggc cgc caa ggc cgt gga gac gga 1296
Ser Gly Glu Ala Glu Gly Ser Gly Arg Gln Gly Arg Gly Asp Gly
395 400 405

gaa gca gag ggc agc tga agc cac gaa ggt tgc cga agc gga gaa gca 1344
Glu Ala Glu Gly Ser Ser His Glu Gly Cys Arg Ser Gly Glu Ala
410 415 420

gaa ggc agc tga ggc cgc caa ggc cgt gga gac gga gaa gca gag ggc 1392
Glu Gly Ser Gly Arg Gln Gly Arg Gly Asp Gly Glu Ala Glu Gly
425 430 435

agc tga agc cac gaa ggt tgc cga agc gga gaa gca gaa ggc agc tga 1440
Ser Ser His Glu Gly Cys Arg Ser Gly Glu Ala Glu Gly Ser
440 445 450

ggc cgc caa ggc cgt gga gac gga gaa gca gag ggc agc tga agc cac 1488
Gly Arg Gln Gly Arg Gly Asp Gly Glu Ala Glu Gly Ser Ser His
455 460 465

gaa ggt tgc cga agc gga gaa gga tat cga tcc 1521
Glu Gly Cys Arg Ser Gly Glu Gly Tyr Arg Ser
470 475

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 2

Tyr Gly Pro Ser Cys Gly Ala
1 5

<210> 3
<211> 46
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 3

Gly Trp Ser Ala Leu Arg Gly Gly Gln Cys Gln Gln Pro Arg Ser Arg
1 5 10 15

Asn Leu Gln Trp Arg Cys His Phe Val Tyr Tyr Gly Arg Thr Ala Gly

25

20

25

30

Pro Ile Val His Gln Thr Val Gln Pro Tyr Lys Trp Arg Ser
35 40 45

<210> 4
<211> 36
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 4

Leu Val Cys Val Gly His Gly Gln Ile Thr His His Phe Cys Pro Thr
1 5 10 15

Ser Glu Lys Asn Val His His Ser Val Tyr Asn Arg Ile Pro Ala Gly
20 25 30

Cys Ser Ser Asn
35

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 5

Arg Glu Glu Ser Phe Asp Val Cys His Leu Gln Phe His Glu Asn Ser
1 5 10 15

Cys Asp

<210> 6
<211> 32
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 6

Tyr Ala Gly Ser His Asn Pro Glu Gly Val Leu Ala Ser Trp Lys Cys
1 5 10 15

Gly Leu His Gly Leu Ser Glu Phe Pro His Ala His Asp Arg Gly Gly
20 25 30

<210> 7
<211> 47
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 7

Thr Pro Leu Leu Arg His Ile Lys Trp Asn Pro Ile His His Val Phe
1 5 10 15

Thr Arg His Gln Asn Glu Asp Gly Ser Thr Gln Asn Leu Pro Gly Cys
20 25 30

Val Val Ala Val Ala Thr Trp Ala His Cys Phe Ala Cys Glu Tyr
35 40 45

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 8

Gln Thr Cys Ile Leu Arg Cys Tyr Arg Leu Gln Cys Ile His Cys Thr
1 5 10 15

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 9

Trp Leu Val Ser Ser Asp Trp Ile His Gly Pro Ala Pro Thr Gly Arg
1 5 10 15

Lys

<210> 10
<211> 23
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 10

Phe Gln Lys Arg Asn Asp Lys Ala Thr Arg Lys Ser Glu Lys Gly Arg
1 5 10 15

Glu Arg Lys Ile Gly Arg His
20

<210> 11
<211> 24
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 11

Pro Gly Asn Gln Ala Gly Arg Gly Thr Lys Pro Ser Val Gln Ser Ser
1 5 10 15

Thr Gln Gly Arg Gly Gly Lys Gly
20

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> T. CRUZI

<400> 12

Asn Ile Ser Thr Pro Tyr Asn Ile
1 5

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> T. CRUZI

<400> 13

Val Gly Lys Tyr
1

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> T. CRUZI

<400> 14

Leu Lys Glu Lys Ala Lys
1 5

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> T. CRUZI

<400> 15

Arg Ser Phe Lys Ser Gly
1 5

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> T. CRUZI

<400> 16

Glu Lys Lys Phe
1

<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 17

Asn Arg Lys Asn
1

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 18

Arg Ser Arg Glu Thr Glu Gly Gly
1 5

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 19

Gly Cys Gln Gly Arg Gly Asp Gly Glu Ala Glu Gly Ser
1 5 10

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 20

Gly His Glu Gly Cys Arg Ser Gly Glu Ala Glu Gly Ser
1 5 10

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 21

Gly Arg Gln Gly Arg Gly Asp Gly Glu Ala Glu Gly Ser
1 5 10

<210> 22

<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 22

Ser His Glu Gly Cys Arg Ser Gly Glu Ala Glu Gly Ser
1 5 10

<210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 23

Gly Arg Gln Gly Arg Gly Asp Gly Glu Ala Glu Gly Ser
1 5 10

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 24

Ser His Glu Gly Cys Arg Ser Gly Glu Ala Glu Gly Ser
1 5 10

<210> 25
<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 25

Ser His Glu Gly Cys Arg Ser Gly Glu Ala Glu Gly Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 26

Gly Arg Gln Gly Arg Gly Asp Gly Glu Ala Glu Gly Ser
1 5 10

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 27

Ser His Glu Gly Cys Arg Ser Gly Glu Ala Glu Gly Ser
1 5 10

<210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 28

Gly Arg Gln Gly Arg Gly Asp Gly Glu Ala Glu Gly Ser
1 5 10

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 29

Ser His Glu Gly Cys Arg Ser Gly Glu Ala Glu Gly Ser
1 5 10

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 30

Gly Arg Gln Gly Arg Gly Asp Gly Glu Ala Glu Gly Ser
1 5 10

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> T. CRUZI

<400> 31

Ser His Glu Gly Cys Arg Ser Gly Glu Gly Tyr Arg Ser
1 5 10

<210> 32
<211> 42
<212> DNA
<213> T. CRUZI

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 32

```

nnnnctatta ttgatacagt ttctgtacta tattggttgt gc 42

<210> 33
<211> 3749
<212> DNA
<213> T CRUZI

<220>
<221> CDS
<222> (833) .. (2575)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (833) .. (937)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (938) .. (2575)

<400> 33
ccccctcgag gtcgacctgc aggtcaacgg atcttacctg agtacaaaag gtcaagtgag 60
cgggtcaaaag gatgtatata tacatatata accataaggg aaacatttgg gcattttaact 120
gcctttacat ttcccttttc cttcaatata ttgtttgttt gtttttggtt tctataggaa 180
atcttaggat ccggccagcg gcataggaga ttattctctt ttttattaat tgcttaatgc 240
gttgggtctgt gtgtgtgttg gttcccttgc gcgagctcac ggggcctaata tatgattggt 300
gcgcatatgc atatatatat atatatatat acatgtgtgt gtgtgtgtat atgtacgttt 360
gttgggtttgc cgctgtactc ccgcctgcgt gtgtctgtct ctctctctgt gtgtgtgatg 420
ggctgcttct ctttcttttg ttgcgtccct ttattattat tatttttttt tcttctctcc 480
cacttctctc ccggtgtggt gcacgcacag taaagataga gggagaaata gagcgagtgt 540
ttgtatcagt gtctccgttg cggctggtac tggtagaagg agaagaatag aagaaggaga 600
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagagaga gagagagaga agggcgaacg agaaaaaaga 660
agaagaaca tttgagaagg aattggaacg aaaattgtaa gaggaagcaa aaaaaaaaaa 720
aaaaagtgtg tgtgtgtgag agagagagag agaggaagcc aataataata aaaagcaaac 780
aaaaaagcaa aaacaaaaat atttgtagac cggacgtccc gtcttggacg tg atg ttt 838
Met Phe
-35

tca aaa agg acg tcg cca gca ccc ttc cgt gcg ctc ctg ctg ccg gtc 886
Ser Lys Arg Thr Ser Pro Ala Pro Phe Arg Ala Leu Leu Leu Pro Val
-30 -25 -20

gtg gtg gtg gtg gtg gtg gtg gca tct gtg gcc ctc cct gca gga 934
Val Val Val Val Val Val Val Val Ala Ser Val Ala Leu Pro Ala Gly
-15 -10 -5

```

gcg cag ttt gat tta agg cag cag cag ctg gtt ata cag gat ttc ttc Ala Gln Phe Asp Leu Arg Gln Gln Gln Leu Val Ile Gln Asp Phe Phe -1 1 5 10 15	982
atc agt cgc tcc tgc gca gga tgt tca cag ggg caa acc gat ggc cca Ile Ser Arg Ser Cys Ala Gly Cys Ser Gln Gly Gln Thr Asp Gly Pro 20 25 30	1030
agc ggt gcc ggc aca ctc ttc act gcc gcc ggt ggt tcg ctt ggc aaa Ser Gly Ala Gly Thr Leu Phe Thr Ala Ala Gly Gly Ser Leu Gly Lys 35 40 45	1078
gat gct tcc acg ctg ctg ttg tgt gac caa ggt ggt ggt ggc tcc agc Asp Ala Ser Thr Leu Leu Leu Cys Asp Gln Gly Gly Gly Gly Ser Ser 50 55 60	1126
gtg cgt ttg gtg aac aaa tcc ggc att ttc acc ctt gcc ggt agt aaa Val Arg Leu Val Asn Lys Ser Gly Ile Phe Thr Leu Ala Gly Ser Lys 65 70 75	1174
acg acg cgt ggc aat caa aat ggt ccg gcg gcg acg gca ctc ttc aac Thr Thr Arg Gly Asn Gln Asn Gly Pro Ala Ala Thr Ala Leu Phe Asn 80 85 90 95	1222
atg ccc cga gct gtg gtg ctt gag gat gga gcg ctt tac gtg gcg gac Met Pro Arg Ala Val Val Leu Glu Asp Gly Ala Leu Tyr Val Ala Asp 100 105 110	1270
agt gcc aac aac ctc gtt cga gaa atc tcc aat ggc att gtc act tcg Ser Ala Asn Asn Leu Val Arg Glu Ile Ser Asn Gly Ile Val Thr Ser 115 120 125	1318
ttt att acg gag gga ctg ctg ggc cca tcg tac atc aaa ccg tac agc Phe Ile Thr Glu Gly Leu Leu Gly Pro Ser Tyr Ile Lys Pro Tyr Ser 130 135 140	1366
cgt cca aat ggc gcc cat gac ttg ttt gtg tcg gac acg ggc aaa tct Arg Pro Asn Gly Ala His Asp Leu Phe Val Ser Asp Thr Gly Lys Ser 145 150 155	1414
cgc atc att ttt gcc cca ctt cag aaa caa acg ttc atc aca gtg ttt Arg Ile Ile Phe Ala Pro Leu Gln Lys Gln Thr Phe Ile Thr Val Phe 160 165 170 175	1462
ata aca gga ttc cag ccg gat gtt ctt caa att agc gag aag agt cgt Ile Thr Gly Phe Gln Pro Asp Val Leu Gln Ile Ser Glu Lys Ser Arg 180 185 190	1510
ttg atg ttt gcc atc tgc aat tcc acg aaa att ctt tcg att aat atg Leu Met Phe Ala Ile Cys Asn Ser Thr Lys Ile Leu Ser Ile Asn Met 195 200 205	1558
cag gga gcc aca acc ccg aag gat tac tgg caa gtt gga aat gcg gac Gln Gly Ala Thr Thr Pro Lys Asp Tyr Trp Gln Val Gly Asn Ala Asp 210 215 220	1606
tgc atg ggc tat cag agt tct ctc atg ctc acg acc gag gag gat aaa Cys Met Gly Tyr Gln Ser Ser Leu Met Leu Thr Thr Glu Glu Asp Lys 225 230 235	1654

ctc ctc tac tac ggc ata tta aat gga acc cca tcc atc atg tct tta Leu Leu Tyr Tyr Gly Ile Leu Asn Gly Thr Pro Ser Ile Met Ser Leu 240 245 250 255	1702
ccc gcc acc aaa acg aag acg gaa gca ccc aga att tgc ccg gat gtg Pro Ala Thr Lys Thr Lys Thr Glu Ala Pro Arg Ile Cys Pro Asp Val 260 265 270	1750
ttg ttg cgg tgg cca cat ggg ccc att gtt tgc ctt gtg aat att aac Leu Leu Arg Trp Pro His Gly Pro Ile Val Ser Leu Val Asn Ile Asn 275 280 285	1798
aaa cat gca ttt tac gtt gtt acc gcc tcc aat gta tac att gta cat Lys His Ala Phe Tyr Val Val Thr Ala Ser Asn Val Tyr Ile Val His 290 295 300	1846
gat ggc tct tat cat ccg act gtg acg ccg aca cct cct ctg aca ccg Asp Gly Ser Tyr His Pro Thr Val Thr Pro Thr Pro Pro Leu Thr Pro 305 310 315	1894
acg cct aca cca gaa gtg aca ccc aca cct act gtg acc ccg acg cct Thr Pro Thr Pro Glu Val Thr Pro Thr Pro Thr Val Thr Pro Thr Pro 320 325 330 335	1942
aca ccg gaa gtg aca ccg aca ccg cca gtg act ccg agc ccc acc atc Thr Pro Glu Val Thr Pro Thr Pro Pro Val Thr Pro Ser Pro Thr Ile 340 345 350	1990
aca atc cac cgg ggt ttt gct gtg gca gcc ttt cct gcc caa agt ctt Thr Ile His Arg Gly Phe Ala Val Ala Ala Phe Pro Ala Gln Ser Leu 355 360 365	2038
cca atc gaa gac ccg cgg ctt atg cat gaa ctg ctt tct tgg tta atg Pro Ile Glu Asp Pro Arg Leu Met His Glu Leu Leu Ser Trp Leu Met 370 375 380	2086
aag gat gta ggg att gcg ttc gaa tcc acg gac ttt ttt gcc gta ttt Lys Asp Val Gly Ile Ala Phe Glu Ser Thr Asp Phe Phe Ala Val Phe 385 390 395	2134
cct cca gat aga gag gtt ttg gtg ccc ggt tat gta aat gtc tcc acc Pro Pro Asp Arg Glu Val Leu Val Pro Gly Tyr Val Asn Val Ser Thr 400 405 410 415	2182
tgg aat aac ttg acg gtg cta ttc aac ttt gac cgc acc att gtc atc Trp Asn Asn Leu Thr Val Leu Phe Asn Phe Asp Arg Thr Ile Val Ile 420 425 430	2230
acg gaa tat ttc act cca gag ggc atg tct tca gag gag gga cag gcc Thr Glu Tyr Phe Thr Pro Glu Gly Met Ser Ser Glu Glu Gly Gln Ala 435 440 445	2278
cga ctc ttc gct tgc ccg tgg tac tgg acg aga aat ttc ctt gat tca Arg Leu Phe Ala Ser Pro Trp Tyr Trp Thr Arg Asn Phe Leu Asp Ser 450 455 460	2326
tta aag aaa aca gta gct tgg aag gac ttg gag gcg ttt tgc atg gtc Leu Lys Lys Thr Val Ala Trp Lys Asp Leu Glu Ala Phe Cys Met Val 465 470 475	2374

aac tgc gtt gaa cac tgt gag aca atg aca ttc cat aag tca gaa tgt 2422
 Asn Cys Val Glu His Cys Glu Thr Met Thr Phe His Lys Ser Glu Cys
 480 485 490 495
 gta ggc tac gtc cgg ccc cca gta tgc aac gac gtc tgt gtg ggg gcg 2470
 Val Gly Tyr Val Arg Pro Pro Val Cys Asn Asp Val Cys Val Gly Ala
 500 505 510
 gta gtg tcc tcc gtg gtg ctt ggc gcc aca ggt atc gca ctc att gca 2518
 Val Val Ser Ser Val Val Leu Gly Ala Thr Gly Ile Ala Leu Ile Ala
 515 520 525
 ctg atg gtt gga agt tgc gcg aac tta cgg agc gct gtg att ctt gtt 2566
 Leu Met Val Gly Ser Ser Ala Asn Leu Arg Ser Ala Val Ile Leu Val
 530 535 540
 cca ccc atg tagattttgt cccacactt tggagaaagg tgggaaatga 2615
 Pro Pro Met
 545
 cttcagaaat tgaaattaga aggaaccaac aacacaagaa gcaagcgaag gtgaaaacaa 2675
 cgggaagaag aagaagaaga aaaaaaaaaa aagaaaagaa aaaaatgggg ggctgagtgg 2735
 ggaaaagaga aagaaaagaa gtgtgcgtgt aaccgtgtgt gtgtgtgccg gggaaaaaga 2795
 agaaacacaa aagatttctt ttttgttttt tgttttaatg gtgcaaagag ggaacaaga 2855
 aagcgaaggg tgcattgtgtg tctgtagata tataaaaata aacatatgcc cccgcattga 2915
 ttttaccgtt ggcagttccg tggcttcttt tttttttttt tttttgtatt tttgttattt 2975
 tttcctctta tttcttcgtg tgtgtgtgta tgtattatta ttcttttttg tttttgttt 3035
 gtttgtttgt ttttacctac tcatctgcct tcattttttt ttttgtgtgt tttcactcag 3095
 cccctctctc tttctctctt cttcttctct cttcatgcgt gtatttccgc atggagtggg 3155
 aaaggaacgg ctgggagcga ttgtgatggg gcttgtgttg gaggtgtggc tatgcgagta 3215
 gtggagatgc atgtatgtat gtatatatgt ggtttggtgt atatatttaa atattatatg 3275
 ttgttgttgt tgcgtgccga ctctcggggg acgtacaccg acctacttac ttacagagag 3335
 agagagagag aggaagagaa tgagagaaaa gggggggcgtg tgggtgtgttc tgtattcatt 3395
 gaagagcgca aaaataaata aaaataaaat aataaaatga gggagagaga agggaggagg 3455
 aaacagcaga ggaatttgta tgccatcggt gtgactaatt tttcataagg actctgtgat 3515
 ggccctgtta accacgtcca ctgcagtaga cgagtcacaa ttgactgcga gtgttacgcc 3575
 aactgtacgt ctgtctccct cgtgctgtac gtgtgcaagt aagtacgtgt gtgcactgtg 3635
 cgtgtgcgtg tgtgtgtgtg tcaagggcgc cttttacgtg tctgtgcgct tgagtgggga 3695
 ggggagaaga ggaggagaga cgaagaaaga aagaaagaaa aaagcgggcg gcgc 3749

<211> 581
 <212> PRT
 <213> T CRUZI

<400> 34

Met Phe Ser Lys Arg Thr Ser Pro Ala Pro Phe Arg Ala Leu Leu Leu
 -35 -30 -25 -20

Pro Val Val Val Val Val Val Val Val Val Ala Ser Val Ala Leu Pro
 -15 -10 -5

Ala Gly Ala Gln Phe Asp Leu Arg Gln Gln Gln Leu Val Ile Gln Asp
 -1 1 5 10

Phe Phe Ile Ser Arg Ser Cys Ala Gly Cys Ser Gln Gly Gln Thr Asp
 15 20 25

Gly Pro Ser Gly Ala Gly Thr Leu Phe Thr Ala Ala Gly Gly Ser Leu
 30 35 40 45

Gly Lys Asp Ala Ser Thr Leu Leu Leu Cys Asp Gln Gly Gly Gly Gly
 50 55 60

Ser Ser Val Arg Leu Val Asn Lys Ser Gly Ile Phe Thr Leu Ala Gly
 65 70 75

Ser Lys Thr Thr Arg Gly Asn Gln Asn Gly Pro Ala Ala Thr Ala Leu
 80 85 90

Phe Asn Met Pro Arg Ala Val Val Leu Glu Asp Gly Ala Leu Tyr Val
 95 100 105

Ala Asp Ser Ala Asn Asn Leu Val Arg Glu Ile Ser Asn Gly Ile Val
 110 115 120 125

Thr Ser Phe Ile Thr Glu Gly Leu Leu Gly Pro Ser Tyr Ile Lys Pro
 130 135 140

Tyr Ser Arg Pro Asn Gly Ala His Asp Leu Phe Val Ser Asp Thr Gly
 145 150 155

Lys Ser Arg Ile Ile Phe Ala Pro Leu Gln Lys Gln Thr Phe Ile Thr
 160 165 170

Val Phe Ile Thr Gly Phe Gln Pro Asp Val Leu Gln Ile Ser Glu Lys
 175 180 185

Ser Arg Leu Met Phe Ala Ile Cys Asn Ser Thr Lys Ile Leu Ser Ile
 190 195 200 205
 Asn Met Gln Gly Ala Thr Thr Pro Lys Asp Tyr Trp Gln Val Gly Asn
 210 215 220
 Ala Asp Cys Met Gly Tyr Gln Ser Ser Leu Met Leu Thr Thr Glu Glu
 225 230 235
 Asp Lys Leu Leu Tyr Tyr Gly Ile Leu Asn Gly Thr Pro Ser Ile Met
 240 245 250
 Ser Leu Pro Ala Thr Lys Thr Lys Thr Glu Ala Pro Arg Ile Cys Pro
 255 260 265
 Asp Val Leu Leu Arg Trp Pro His Gly Pro Ile Val Ser Leu Val Asn
 270 275 280 285
 Ile Asn Lys His Ala Phe Tyr Val Val Thr Ala Ser Asn Val Tyr Ile
 290 295 300
 Val His Asp Gly Ser Tyr His Pro Thr Val Thr Pro Thr Pro Pro Leu
 305 310 315
 Thr Pro Thr Pro Thr Pro Glu Val Thr Pro Thr Pro Thr Val Thr Pro
 320 325 330
 Thr Pro Thr Pro Glu Val Thr Pro Thr Pro Pro Val Thr Pro Ser Pro
 335 340 345
 Thr Ile Thr Ile His Arg Gly Phe Ala Val Ala Ala Phe Pro Ala Gln
 350 355 360 365
 Ser Leu Pro Ile Glu Asp Pro Arg Leu Met His Glu Leu Leu Ser Trp
 370 375 380
 Leu Met Lys Asp Val Gly Ile Ala Phe Glu Ser Thr Asp Phe Phe Ala
 385 390 395
 Val Phe Pro Pro Asp Arg Glu Val Leu Val Pro Gly Tyr Val Asn Val
 400 405 410
 Ser Thr Trp Asn Asn Leu Thr Val Leu Phe Asn Phe Asp Arg Thr Ile
 415 420 425

Val Ile Thr Glu Tyr Phe Thr Pro Glu Gly Met Ser Ser Glu Glu Gly
430 435 440 445

Gln Ala Arg Leu Phe Ala Ser Pro Trp Tyr Trp Thr Arg Asn Phe Leu
450 455 460

Asp Ser Leu Lys Lys Thr Val Ala Trp Lys Asp Leu Glu Ala Phe Cys
465 470 475

Met Val Asn Cys Val Glu His Cys Glu Thr Met Thr Phe His Lys Ser
480 485 490

Glu Cys Val Gly Tyr Val Arg Pro Pro Val Cys Asn Asp Val Cys Val
495 500 505

Gly Ala Val Val Ser Ser Val Val Leu Gly Ala Thr Gly Ile Ala Leu
510 515 520 525

Ile Ala Leu Met Val Gly Ser Ser Ala Asn Leu Arg Ser Ala Val Ile
530 535 540

Leu Val Pro Pro Met
545

<210> 35
<211> 2151
<212> DNA
<213> T CRUZI

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2151)

<400> 35
atg gcc cga gct gtg gtg ctt gag gat gga gcg ctt tac gtg gcg gac 48
Met Ala Arg Ala Val Val Leu Glu Asp Gly Ala Leu Tyr Val Ala Asp
1 5 10 15

aat gcc aac aac ctc gtt cga gaa atc tcc aat ggc gtt gtc act tcg 96
Asn Ala Asn Asn Leu Val Arg Glu Ile Ser Asn Gly Val Val Thr Ser
20 25 30

ttt att acg gaa gga ctg ctg ggc cca tcg tac atc aaa ccg tac agc 144
Phe Ile Thr Glu Gly Leu Leu Gly Pro Ser Tyr Ile Lys Pro Tyr Ser
35 40 45

cgt aca aat ggc gct cat gac ttg ttt gtg tcg gac acg ggc aaa tca 192
Arg Thr Asn Gly Ala His Asp Leu Phe Val Ser Asp Thr Gly Lys Ser
50 55 60

cgc atc att ttt gcc cca cct cag aaa aaa acg ttc atc aca gtg ttt 240

Arg 65	Phe 66	Phe 67	Phe 68	Ala 69	Pro 70	Pro 71	Gln 72	Lys 73	Lys 74	Thr 75	Phe 76	Ile 77	Thr 78	Val 79	Phe 80	
ata	aca	gga	ttc	cag	cog	gat	gtt	ctt	caa	att	agc	gag	aag	agt	cgt	288
Ile	Thr	Gly	Phe	Gln	Pro	Asp	Val	Leu	Gln	Ile	Ser	Glu	Lys	Ser	Arg	
				85					90					95		
ttg	atg	ttt	gcc	atc	tgc	aat	tcc	acg	aaa	att	ctt	gcg	att	aat	atg	336
Leu	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	Asn	Ser	Thr	Lys	Ile	Leu	Ala	Ile	Asn	Met	
			100					105					110			
cag	gga	gcc	aca	acc	ccg	aag	gag	tac	tgg	caa	gtt	gga	aat	gcg	gac	384
Gln	Gly	Ala	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Tyr	Trp	Gln	Val	Gly	Asn	Ala	Asp	
		115					120					125				
tgc	atg	ggc	tat	cag	agt	tcc	ctc	atg	ctc	acg	acc	gag	gag	gat	aaa	432
Cys	Met	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Leu	Met	Leu	Thr	Thr	Glu	Glu	Asp	Lys	
	130					135					140					
ctc	ctc	tac	tac	ggc	ata	tta	aat	gga	acc	cca	tcc	atc	atg	tct	tta	480
Leu	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Leu	Asn	Gly	Thr	Pro	Ser	Ile	Met	Ser	Leu	
145					150					155					160	
ccc	gcc	acc	aaa	acg	aag	acg	gaa	gca	ccc	aga	att	tgc	ccg	gat	gtg	528
Pro	Ala	Thr	Lys	Thr	Lys	Thr	Glu	Ala	Pro	Arg	Ile	Cys	Pro	Asp	Val	
				165					170					175		
ttg	ttg	cag	tgg	cca	cat	ggg	ccc	att	gtt	tcg	ctt	gtg	aat	att	aac	576
Leu	Leu	Gln	Trp	Pro	His	Gly	Pro	Ile	Val	Ser	Leu	Val	Asn	Ile	Asn	
		180					185						190			
aaa	cat	gca	ttt	tac	gtt	gtt	acc	gcc	tcc	aat	gta	tac	att	gta	cat	624
Lys	His	Ala	Phe	Tyr	Val	Val	Thr	Ala	Ser	Asn	Val	Tyr	Ile	Val	His	
		195					200					205				
gat	ggc	tgc	tat	cat	ccg	act	gga	tcc	atg	gcc	cag	ctc	caa	cag	gca	672
Asp	Gly	Ser	Tyr	His	Pro	Thr	Gly	Ser	Met	Ala	Gln	Leu	Gln	Gln	Ala	
	210					215					220					
gaa	aat	aat	atc	act	aat	tcc	aaa	aaa	gaa	atg	aca	aag	cta	cga	gaa	720
Glu	Asn	Asn	Ile	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys	Glu	Met	Thr	Lys	Leu	Arg	Glu	
225					230					235					240	
aaa	gtg	aaa	aag	gcc	gag	aaa	gaa	aaa	ttg	gac	gcc	att	aac	cgg	gca	768
Lys	Val	Lys	Lys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Leu	Asp	Ala	Ile	Asn	Arg	Ala	
				245					250					255		
acc	aag	ctg	gaa	gag	gaa	cga	aac	caa	gcg	tac	aaa	gca	gca	cac	aag	816
Thr	Lys	Leu	Glu	Glu	Glu	Arg	Asn	Gln	Ala	Tyr	Lys	Ala	Ala	His	Lys	
			260					265					270			
gca	gag	gag	gaa	aag	gct	aaa	aca	ttt	caa	cgc	ctt	ata	aca	ttt	gag	864
Ala	Glu	Glu	Glu	Lys	Ala	Lys	Thr	Phe	Gln	Arg	Leu	Ile	Thr	Phe	Glu	
		275					280					285				
tgc	gaa	aat	att	aac	tta	aag	aaa	agg	cca	aat	gac	gca	gtt	tca	aat	912
Ser	Glu	Asn	Ile	Asn	Leu	Lys	Lys	Arg	Pro	Asn	Asp	Ala	Val	Ser	Asn	
	290					295					300					
cgg	gat	aag	aaa	aaa	aat	tct	gaa	acc	gca	aaa	act	gac	gaa	gta	gag	960

Arg 305	Asp	Lys	Lys	Lys	Asn 310	Ser	Glu	Thr	Ala	Lys 315	Thr	Asp	Glu	Val	Glu 320	
aaa	cag	agg	gcg	gct	gag	gct	gcc	aag	gcc	gtg	gag	acg	gag	aag	cag	1008
Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	
				325					330					335		
agg	gca	gct	gag	gcc	acg	aag	gtt	gcc	gaa	gcg	gag	aag	cgg	aag	gca	1056
Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Arg	Lys	Ala	
			340					345					350			
gct	gag	gcc	gcc	aag	gcc	gtg	gag	acg	gag	aag	cag	agg	gca	gct	gaa	1104
Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	
		355					360					365				
gcc	acg	aag	gtt	gcc	gaa	gcg	gag	aag	cag	aag	gca	gct	gag	gcc	gcc	1152
Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	
		370					375				380					
aag	gcc	gtg	gag	acg	gag	aag	cag	agg	gca	gct	gaa	gcc	acg	aag	gtt	1200
Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	
385					390				395						400	
gcc	gaa	gcg	gag	aag	cag	agg	gca	gct	gaa	gcc	atg	aag	gtt	gcc	gaa	1248
Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Met	Lys	Val	Ala	Glu	
				405					410					415		
gcg	gag	aag	cag	aag	gca	gct	gag	gcc	gcc	aag	gcc	gtg	gag	acg	gag	1296
Ala	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	
			420					425					430			
aag	cag	agg	gca	gct	gaa	gcc	acg	aag	gtt	gcc	gaa	gcg	gag	aag	cag	1344
Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	
		435					440				445					
aag	gca	gct	gag	gcc	gcc	aag	gcc	gtg	gag	acg	gag	aag	cag	agg	gca	1392
Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	
		450					455				460					
gct	gaa	gcc	acg	aag	gtt	gcc	gaa	gcg	gag	aag	cag	aag	gca	gct	gag	1440
Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	
465					470				475						480	
gcc	gcc	aag	gcc	gtg	gag	acg	gag	aag	cag	agg	gca	gct	gaa	gcc	acg	1488
Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	
			485					490					495			
aag	gtt	gcc	gaa	gcg	gag	aag	gat	atc	gat	ccc	atg	ggt	gct	tgt	ggg	1536
Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Asp	Ile	Asp	Pro	Met	Gly	Ala	Cys	Gly	
			500					505					510			
tcg	aag	gac	tcg	acg	agc	gac	aag	ggg	ttg	gcg	agc	gat	aag	gac	ggc	1584
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Lys	Gly	Leu	Ala	Ser	Asp	Lys	Asp	Gly	
		515					520					525				
aag	aac	gcc	aag	gac	cgc	aag	gaa	gcg	tgg	gag	cgc	att	cgc	cag	gcg	1632
Lys	Asn	Ala	Lys	Asp	Arg	Lys	Glu	Ala	Trp	Glu	Arg	Ile	Arg	Gln	Ala	
		530					535				540					
att	cct	cgt	gag	aag	acc	gcc	gag	gca	aaa	cag	cgc	cgc	atc	gag	ctc	1680

Ile Pro Arg Glu Lys Thr Ala Glu Ala Lys Gln Arg Arg Ile Glu Leu
 545 550 555 560
 ttc aag aag ttc gac aag aac gag acc ggg aag ctg tgc tac gat gag 1728
 Phe Lys Lys Phe Asp Lys Asn Glu Thr Gly Lys Leu Cys Tyr Asp Glu
 565 570 575
 gtg cac agc ggc tgc ctc gag gtg ctg aag ttg gac gag ttc acg ccg 1776
 Val His Ser Gly Cys Leu Glu Val Leu Lys Leu Asp Glu Phe Thr Pro
 580 585 590
 cga gtg cgc gac atc acg aag cgt gca ttc gac aag gcg agg gcc ctg 1824
 Arg Val Arg Asp Ile Thr Lys Arg Ala Phe Asp Lys Ala Arg Ala Leu
 595 600 605
 ggc agc aag ctg gag aac aag ggc tcc gag gac ttt gtt gaa ttt ctg 1872
 Gly Ser Lys Leu Glu Asn Lys Gly Ser Glu Asp Phe Val Glu Phe Leu
 610 615 620
 gag ttc cgt ctg atg ctg tgc tac atc tac gac ttc ttc gag ctg acg 1920
 Glu Phe Arg Leu Met Leu Cys Tyr Ile Tyr Asp Phe Phe Glu Leu Thr
 625 630 635 640
 gtg atg ttc gac gag att gac gcc tcc ggc aac atg ctg gtt gac gag 1968
 Val Met Phe Asp Glu Ile Asp Ala Ser Gly Asn Met Leu Val Asp Glu
 645 650 655
 gag gag ttc aag cgc gcc gtg ccc aag ctt gag gcg tgg ggc gcc aag 2016
 Glu Glu Phe Lys Arg Ala Val Pro Lys Leu Glu Ala Trp Gly Ala Lys
 660 665 670
 gtc gag gat ccc gcg gcg ctg ttc aag gag ctc gat aag aac ggc act 2064
 Val Glu Asp Pro Ala Ala Leu Phe Lys Glu Leu Asp Lys Asn Gly Thr
 675 680 685
 ggg tcc gtg acg ttc gac gag ttt gct gcg tgg gct tct gca gtc aaa 2112
 Gly Ser Val Thr Phe Asp Glu Phe Ala Ala Trp Ala Ser Ala Val Lys
 690 695 700
 ctg gac gcc gac ggc gac ccg gac aac gtg ccg gat atc 2151
 Leu Asp Ala Asp Gly Asp Pro Asp Asn Val Pro Asp Ile
 705 710 715

<210> 36
 <211> 717
 <212> PRT
 <213> T CRUZI

<400> 36

Met Ala Arg Ala Val Val Leu Glu Asp Gly Ala Leu Tyr Val Ala Asp
 1 5 10 15

Asn Ala Asn Asn Leu Val Arg Glu Ile Ser Asn Gly Val Val Thr Ser
 20 25 30

Phe Ile Thr Glu Gly Leu Leu Gly Pro Ser Tyr Ile Lys Pro Tyr Ser

35 40 45

Arg Thr Asn Gly Ala His Asp Leu Phe Val Ser Asp Thr Gly Lys Ser
50 55 60

Arg Ile Ile Phe Ala Pro Pro Gln Lys Lys Thr Phe Ile Thr Val Phe
65 70 75 80

Ile Thr Gly Phe Gln Pro Asp Val Leu Gln Ile Ser Glu Lys Ser Arg
85 90 95

Leu Met Phe Ala Ile Cys Asn Ser Thr Lys Ile Leu Ala Ile Asn Met
100 105 110

Gln Gly Ala Thr Thr Pro Lys Glu Tyr Trp Gln Val Gly Asn Ala Asp
115 120 125

Cys Met Gly Tyr Gln Ser Ser Leu Met Leu Thr Thr Glu Glu Asp Lys
130 135 140

Leu Leu Tyr Tyr Gly Ile Leu Asn Gly Thr Pro Ser Ile Met Ser Leu
145 150 155 160

Pro Ala Thr Lys Thr Lys Thr Glu Ala Pro Arg Ile Cys Pro Asp Val
165 170 175

Leu Leu Gln Trp Pro His Gly Pro Ile Val Ser Leu Val Asn Ile Asn
180 185 190

Lys His Ala Phe Tyr Val Val Thr Ala Ser Asn Val Tyr Ile Val His
195 200 205

Asp Gly Ser Tyr His Pro Thr Gly Ser Met Ala Gln Leu Gln Gln Ala
210 215 220

Glu Asn Asn Ile Thr Asn Ser Lys Lys Glu Met Thr Lys Leu Arg Glu
225 230 235 240

Lys Val Lys Lys Ala Glu Lys Glu Lys Leu Asp Ala Ile Asn Arg Ala
245 250 255

Thr Lys Leu Glu Glu Glu Arg Asn Gln Ala Tyr Lys Ala Ala His Lys
260 265 270

Ala Glu Glu Glu Lys Ala Lys Thr Phe Gln Arg Leu Ile Thr Phe Glu

275 280 285

Ser Glu Asn Ile Asn Leu Lys Lys Arg Pro Asn Asp Ala Val Ser Asn
290 295 300

Arg Asp Lys Lys Lys Asn Ser Glu Thr Ala Lys Thr Asp Glu Val Glu
305 310 315 320

Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln
325 330 335

Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Arg Lys Ala
340 345 350

Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu
355 360 365

Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val
385 390 395 400

Ala Glu Ala Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Met Lys Val Ala Glu
405 410 415

Ala Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu
420 425 430

Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln
435 440 445

Lys Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln Arg Ala
450 455 460

Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu
465 470 475 480

Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr
485 490 495

Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Asp Ile Asp Pro Met Gly Ala Cys Gly
500 505 510

Ser Lys Asp Ser Thr Ser Asp Lys Gly Leu Ala Ser Asp Lys Asp Gly

515	520	525
Lys Asn Ala Lys Asp Arg 530	Lys Glu Ala Trp Glu Arg 535	Ile Arg Gln Ala 540
Ile Pro Arg Glu Lys Thr Ala Glu Ala Lys Gln Arg Arg Ile Glu Leu 545	550	555 560
Phe Lys Lys Phe Asp Lys Asn Glu Thr Gly Lys Leu Cys Tyr Asp Glu 565	570	575
Val His Ser Gly Cys Leu Glu Val Leu Lys Leu Asp Glu Phe Thr Pro 580	585	590
Arg Val Arg Asp Ile Thr Lys Arg Ala Phe Asp Lys Ala Arg Ala Leu 595	600	605
Gly Ser Lys Leu Glu Asn Lys Gly Ser Glu Asp Phe Val Glu Phe Leu 610	615	620
Glu Phe Arg Leu Met Leu Cys Tyr Ile Tyr Asp Phe Phe Glu Leu Thr 625	630	635 640
Val Met Phe Asp Glu Ile Asp Ala Ser Gly Asn Met Leu Val Asp Glu 645	650	655
Glu Glu Phe Lys Arg Ala Val Pro Lys Leu Glu Ala Trp Gly Ala Lys 660	665	670
Val Glu Asp Pro Ala Ala Leu Phe Lys Glu Leu Asp Lys Asn Gly Thr 675	680	685
Gly Ser Val Thr Phe Asp Glu Phe Ala Ala Trp Ala Ser Ala Val Lys 690	695	700
Leu Asp Ala Asp Gly Asp Pro Asp Asn Val Pro Asp Ile 705	710	715

<210> 37
 <211> 1836
 <212> DNA
 <213> T CRUZI

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1836)

yy

<408> 37

atg gag cag gag cgc agg cag ctg ctc gag aag gac ccg cgc agg aac	48
Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn	
1 5 10 15	
gcg aag gag atc gct gcg ctt gag gag agc atg aat gcc cgc gca cag	96
Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln	
20 25 30	
gag ctg gca cgc gag aag aag ctt gct gac cgc gcg ttc ctc gac cag	144
Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln	
35 40 45	
aag ccg gag ggc gtg ccg ctg cga gag ctg ccg ctc gac gac gac agc	192
Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser	
50 55 60	
gac ttt gtt gct atg gag cag gag cgc agg cag ctg ctc gag aag gac	240
Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp	
65 70 75 80	
ccg cgc agg aac gcg aag gag atc gct gcg ctt gag gag agc atg aat	288
Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn	
85 90 95	
gcc cgc gca cag gag ctg gca cgc gag aag aag ctt gct gac cgc gcg	336
Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala	
100 105 110	
ttc ctc gac cag aag ccg gag ggc gtg ccg ctg cga gag ctg ccg ctc	384
Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu	
115 120 125	
gac gac gac agc gac ttt gtt gct atg gag cag gag cgc agg cag ctg	432
Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu	
130 135 140	
ctc gag aag gac ccg cgc agg aac gcg aag gag atc gct gcg ctt gag	480
Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu	
145 150 155 160	
gag agc atg aat gcc cgc gca cag gag ctg gca cgc gag aag aag ctt	528
Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu	
165 170 175	
gct gac cgc gcg ttc ctc gac cag aag ccg gag ggc gtg ccg ctg cga	576
Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg	
180 185 190	
gag ctg ccg ctc gac gac gac agc gac ttt gtt gct atg gag cag gag	624
Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu	
195 200 205	
cgc agg cag ctg ctc gag aag gac ccg cgc agg aac gcg aag gag atc	672
Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile	
210 215 220	
gct gcg ctt gag gag agc atg aat gcc cgc gca cag gag ctg gca cgc	720
Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg	
225 230 235 240	

gag aag aag ctt gct gac cgc gcg ttc ctc gac cag aag ccg gag ggc Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly 245 250 255	768
gtg ccg ctg cga gag ctg ccg ctc gac gac gac agc gac ttt gtt gct Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala 260 265 270	816
atg gag cag gag cgc agg cag ctg ctc gag aag gac ccg cgc agg aac Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn 275 280 285	864
gcg aag gag atc gct gcg ctt gag gag agc atg aat gcc cgc gca cag Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln 290 295 300	912
gag ctg gca cgc gag aag aag ctt gct gac cgc gcg ttc ctc gac cag Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln 305 310 315 320	960
aag ccg gag ggc gtg ccg ctg cga gag ctg ccg ctc gac gac gac agc Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser 325 330 335	1008
gac ttt gtt gct atg gag cag gag cgc agg cag ctg ctc gag aag gac Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp 340 345 350	1056
ccg cgc agg aac gcg aag gag atc gct gcg ctt gag gag agc atg aat Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn 355 360 365	1104
gcc cgc gca cag gag ctg gca cgc gag aag aag ctt gct gac cgc gcg Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala 370 375 380	1152
ttc ctc gac cag aag ccg gag ggc gtg ccg ctg cga gag ctg ccg ctc Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu 385 390 395 400	1200
gac gac gac agc gac ttt gtt gct atg gag cag gag cgc agg cag ctg Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu 405 410 415	1248
ctc gag aag gac ccg cgc agg aac gcg aag gag atc gct gcg ctt gag Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu 420 425 430	1296
gag agc atg aat gcc cgc gca cag gag ctg gca cgc gag aag aag ctt Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu 435 440 445	1344
gct gac cgc gcg ttc ctc gac cag aag ccg gag ggc gtg ccg ctg cga Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg 450 455 460	1392
gag ctg ccg ctc gac gac gac agc gac ttt gtt gct atg gag cag gag Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu 465 470 475 480	1440

cgc agg cag ctg ctc gag aag gac ccg cgc agg aac gcg aag gag atc 1488
 Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile 495
 485 490

gct gcg ctt gag gag agc atg aat gcc cgc gca cag gag ctg gca cgc 1536
 Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg 510
 500 505 510

gag aag aag ctt gct gac cgc gcg ttc ctc gac cag aag ccg gag ggc 1584
 Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly 525
 515 520

gtg ccg ctg cga gag ctg ccg ctc gac gac gac agc gac ttt gtt gct 1632
 Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala 540
 530 535

atg gag cag gag cgc agg cag ctg ctc gag aag gac ccg cgc agg aac 1680
 Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn 560
 545 550 555 560

gcg aag gag atc gct gcg ctt gag gag agc atg aat gcc cgc gca cag 1728
 Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln 575
 565 570

gag ctg gca cgc gag aag aag ctt gct gac cgc gcg ttc ctc gac cag 1776
 Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln 590
 580 585

aag ccg gag ggc gtg ccg ctg cga gag ctg ccg ctc gac gac gac agc 1824
 Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser 605
 595 600

gac ttt gtt gct 1836
 Asp Phe Val Ala 610

<210> 38
 <211> 612
 <212> PRT
 <213> T CRUZI

<400> 38

Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn
 1 5 10 15

Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln
 20 25 30

Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln
 35 40 45

Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser
 50 55 60

42

Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp
65 70 75 80

Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn
85 90 95

Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala
100 105 110

Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu
115 120 125

Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu
130 135 140

Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu
145 150 155 160

Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu
165 170 175

Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg
180 185 190

Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu
195 200 205

Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile
210 215 220

Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg
225 230 235 240

Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly
245 250 255

Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala
260 265 270

Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn
275 280 285

Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln
290 295 300

Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln
305 310 315 320

Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser
325 330 335

Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp
340 345 350

Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn
355 360 365

Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala
370 375 380

Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu
385 390 395 400

Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu
405 410 415

Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu
420 425 430

Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu
435 440 445

Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg
450 455 460

Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu
465 470 475 480

Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile
485 490 495

Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg
500 505 510

Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly
515 520 525

Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala
530 535 540

Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn
545 550 555 560

Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln
565 570 575

Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln
580 585 590

Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser
595 600 605

Asp Phe Val Ala
610

<210> 39
<211> 621
<212> DNA
<213> T CRUZI

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(621)

<400> 39
ttt aat cct tct acg gac aaa trg aag cta aac caa caa aat aag cct 48
Phe Asn Pro Ser Thr Asp Lys Leu Lys Leu Asn Gln Gln Asn Lys Pro
1 5 10 15
cat att gca aat aat aaa caa aaa aca aca ctc gaa aaa act caa aca 96
His Ile Ala Asn Asn Lys Gln Lys Thr Thr Leu Glu Lys Thr Gln Thr
20 25 30
gaa caa aaa aca gcg cca ttt gga cag gcc gca gca ggg tgg aca aaa 144
Glu Gln Lys Thr Ala Pro Phe Gly Gln Gly Ala Ala Gly Trp Thr Lys
35 40 45
cca tca cca ttt gga cag gcc gca gca ggt gac aaa cca cca cca ttt 192
Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe
50 55 60
gga cag gcc gca gca ggt gac aaa cca cca cca ttt gga cag gcc gca 240
Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe Gly Gln Ala Ala
65 70 75 80
gca ggt gac aaa cca tca cta ttt gga cag gcc gca gca ggt gac aaa 288
Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys
85 90 95
cca tca cca ttt gga cag gcc gca gca ggt gac aaa cca cca cca ttt 336
Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe
100 105 110
gga cag gcc gca gca ggt gac aaa cca tca cta ttt gga cag gcc gca 384

Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu Phe Gly Gln Ala Ala
 115 120 125
 gca ggt gac aaa cca tca cca ttt gga cag gcc gca gca ggt gac aaa 432
 Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys
 130 135 140
 cca cca cca ttt gga cag gcc gca gca ggt gac aaa cca cca cca ttt 480
 Pro Pro Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe
 145 150 155 160
 gga cag gcc gca gca ggt gac aaa cca tca cta ttt gga cag gcc gca 528
 Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu Phe Gly Gln Ala Ala
 165 170 175
 gca ggt gac aaa cca tca cca ttt gga cag gga act gog ttt gat gcc 576
 Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala
 180 185 190
 tct cga agc act gtg ttt gcg aat gog cct ggt gtt gcc cag gtg 621
 Ser Arg Ser Thr Val Phe Ala Asn Ala Pro Gly Val Ala Gln Val
 195 200 205
 <210> 40
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> T CRUZI
 <400> 40
 Phe Asn Pro Ser Thr Asp Lys Leu Lys Leu Asn Gln Gln Asn Lys Pro
 1 5 10 15
 His Ile Ala Asn Asn Lys Gln Lys Thr Thr Leu Glu Lys Thr Gln Thr
 20 25 30
 Glu Gln Lys Thr Ala Pro Phe Gly Gln Gly Ala Ala Gly Trp Thr Lys
 35 40 45
 Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe
 50 55 60
 Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe Gly Gln Ala Ala
 65 70 75 80
 Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys
 85 90 95
 Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe
 100 105 110
 Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu Phe Gly Gln Ala Ala

115	120	125
Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys 130	135	140
Pro Pro Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe 145	150	155
Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu Phe Gly Gln Ala Ala 165	170	175
Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala 180	185	190
Ser Arg Ser Thr Val Phe Ala Asn Ala Pro Gly Val Ala Gln Val 195	200	205

<210> 41
 <211> 1845
 <212> DNA
 <213> T CRUZI

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1845)

<400> 41	
ttt aat cct tct acg gac aaa ttg aag cta aac caa caa aat aag cct Phe Asn Pro Ser Thr Asp Lys Leu Lys Leu Asn Gln Gln Asn Lys Pro 1 5 10 15	48
cat att gca aat aat aaa caa aaa aca aca ctc gaa aaa act caa aca His Ile Ala Asn Asn Lys Gln Lys Thr Thr Leu Glu Lys Thr Gln Thr 20 25 30	96
gaa caa aaa aca gcg cca ttt gga cag gcc gca gca ggg tgg aca aaa Glu Gln Lys Thr Ala Pro Phe Gly Gln Gly Ala Ala Gly Trp Thr Lys 35 40 45	144
cca tca cca ttt gga cag gcc gca gca ggt gac aaa cca cca cca ttt Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe 50 55 60	192
gga cag gcc gca gca ggt gac aaa cca cca cca ttt gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe Gly Gln Ala Ala 65 70 75 80	240
gca ggt gac aaa cca tca cta ttt gga cag gcc gca gca ggt gac aaa Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys 85 90 95	288
cca tca cca ttt gga cag gcc gca gca ggt gac aaa cca cca cca ttt Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe 100 105 110 115	336

100	105	110	
gga cag gcc gca gca ggt gac Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp 115	aaa cca tca cta ttt Lys Pro Ser Leu Phe 120	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 125	384
gca ggt gac aaa cca tca cca ttt Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe 130	gga cag gcc gca gca ggt gac Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys 135	gca gca ggt gac aaa Ala Ala Ala Gly Asp Lys 140	432
cca cca cca ttt gga cag gcc gca gca ggt gac Pro Pro Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys 145	aaa cca cca cca ttt Lys Pro Pro Pro Phe 150	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 155	480
gga cag gcc gca gca ggt gac Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys 165	aaa cca tca cta ttt Lys Pro Ser Leu Phe 170	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 175	528
gca ggt gac aaa cca tca cca ttt Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe 180	gga cag gga act gcg ttt gat gcc Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala 185	gca gca ggt gac Ala Ala Ala Gly Asp Lys 190	576
tct cga agc act gtg ttt gcg aat gcg cct ggt gtt gcc cag gtg atg Ser Arg Ser Thr Val Phe Ala Asn Ala Pro Gly Val Ala Gln Val Met 195	gga cag gga act gcg ttt gat gcc Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala 200	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 205	624
gag cag gag cgc agg cag ctg ctc gag aag gac ccg cgc agg aac gcg Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala 210	gga cag gga act gcg ttt gat gcc Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala 215	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 220	672
aag gag atc gct gcg ctt gag gag agc atg aat gcc cgc gca cag gag Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu 225	gga cag gga act gcg ttt gat gcc Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala 230	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 235	720
ctg gca cgc gag aag aag ctt gct gac cgc gcg ttc ctc gac cag aag Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys 245	gga cag gga act gcg ttt gat gcc Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala 250	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 255	768
ccg gag ggc gtg ccg ctg cga gag ctg ccg ctc gac gac gac agc gac Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp 260	gga cag gga act gcg ttt gat gcc Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala 265	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 270	816
ttt gtt gct atg gag cag gag cgc agg cag ctg ctc gag aag gac ccg Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro 275	gga cag gga act gcg ttt gat gcc Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala 280	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 285	864
cgc agg aac gcg aag gag atc gct gcg ctt gag gag agc atg aat gcc Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala 290	gga cag gga act gcg ttt gat gcc Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala 295	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 300	912
cgc gca cag gag ctg gca cgc gag aag aag ctt gct gac cgc gcg ttc Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe 305	gga cag gga act gcg ttt gat gcc Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala 310	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 315	960
ctc gac cag aag ccg gag ggc gtg ccg ctg cga gag ctg ccg ctc gac Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp 325	gga cag gga act gcg ttt gat gcc Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala 330	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 335	1008
gac gac agc gac ttt gtt gct atg gag cag gag cgc agg cag ctg ctc Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu 340	gga cag gga act gcg ttt gat gcc Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala 345	gga cag gcc gca Gly Gln Ala Ala 350	1056

340	345	350	
gag aag gac ccg cgc agg aac gcg aag gag atc gct gcg ctt gag gag Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu 355 360 365			1104
agc atg aat gcc cgc gca cag gag ctg gca cgc gag aag aag ctt gct Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala 370 375 380			1152
gac cgc gcg ttc ctc gac cag aag ccg gag ggc gtg ccg ctg cga gag Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu 385 390 395 400			1200
ctg ccg ctc gac gac gac agc gac ttt gtt gct atg gag cag gag cgc Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg 405 410 415			1248
agg cag ctg ctc gag aag gac ccg cgc agg aac gcg aag gag atc gct Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala 420 425 430			1296
gcg ctt gag gag agc atg aat gcc cgc gca cag gag ctg gca cgc gag Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu 435 440 445			1344
aag aag ctt gct gac cgc gcg ttc ctc gac cag aag ccg gag ggc gtg Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val 450 455 460			1392
ccg ctg cga gag ctg ccg ctc gac gac gac agc gac ttt gtt gct atg Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met 465 470 475 480			1440
gag cag gag cgc agg cag ctg ctc gag aag gac ccg cgc agg aac gcg Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala 485 490 495			1488
aag gag atc gct gcg ctt gag gag agc atg aat gcc cgc gca cag gag Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu 500 505 510			1536
ctg gca cgc gag aag aag ctt gct gac cgc gcg ttc ctc gac cag aag Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys 515 520 525			1584
ccg gag ggc gtg ccg ctg cga gag ctg ccg ctc gac gac gac agc gac Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp 530 535 540			1632
ttt gtt gct atg gag cag gag cgc agg cag ctg ctc gag aag gac ccg Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro 545 550 555 560			1680
cgc agg aac gcg aag gag atc gct gcg ctt gag gag agc atg aat gcc Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala 565 570 575			1728
cgc gca cag gag ctg gca cgc gag aag aag ctt gct gac cgc gcg ttc Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe 580 585 590			1776

54

580 585 590
 ctc gac cag aag ccg gag ggc gtg ccg ctg cga gag ctg ccg ctc gac 1824
 Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp
 595 600 605

 gac gac agc gac ttt gtt gct 1845
 Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala
 610 615

 <210> 42
 <211> 615
 <212> PRT
 <213> T CRUZI

 <400> 42

 Phe Asn Pro Ser Thr Asp Lys Leu Lys Leu Asn Gln Gln Asn Lys Pro
 1 5 10 15

 His Ile Ala Asn Asn Lys Gln Lys Thr Thr Leu Glu Lys Thr Gln Thr
 20 25 30

 Glu Gln Lys Thr Ala Pro Phe Gly Gln Gly Ala Ala Gly Trp Thr Lys
 35 40 45

 Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe
 50 55 60

 Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe Gly Gln Ala Ala
 65 70 75 80

 Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys
 85 90 95

 Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe
 100 105 110

 Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu Phe Gly Gln Ala Ala
 115 120 125

 Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys
 130 135 140

 Pro Pro Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe
 145 150 155 160

 Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu Phe Gly Gln Ala Ala
 165 170 175

55

Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala
180 185 190

Ser Arg Ser Thr Val Phe Ala Asn Ala Pro Gly Val Ala Gln Val Met
195 200 205

Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala
210 215 220

Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu
225 230 235 240

Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys
245 250 255

Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp
260 265 270

Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro
275 280 285

Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala
290 295 300

Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe
305 310 315 320

Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp
325 330 335

Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu
340 345 350

Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu
355 360 365

Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala
370 375 380

Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu
385 390 395 400

Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg
405 410 415

58

Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala
420 425 430

Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu
435 440 445

Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val
450 455 460

Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met
465 470 475 480

Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala
485 490 495

Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu
500 505 510

Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys
515 520 525

Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp
530 535 540

Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro
545 550 555 560

Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala
565 570 575

Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe
580 585 590

Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp
595 600 605

Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala
610 615

<210> 43
<211> 858
<212> DNA
<213> T CRUZI

<220>
<221> CDS

57

<222> (1)..(858)

<400> 43

gat cca acg tat cgt ttt gca aac cac gcg ttc acg ctg gtg gcg tcg	48
Asp Pro Thr Tyr Arg Phe Ala Asn His Ala Phe Thr Leu Val Ala Ser	
1 5 10 15	
gtg acg att cac gag gtt ccg agc gtc gcg agt cct ttg ctg ggt gcg	96
Val Thr Ile His Glu Val Pro Ser Val Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ala	
20 25 30	
agc ctg gac tct tct ggt ggc aaa aaa ctc ctg ggg ctc tcg tac gac	144
Ser Leu Asp Ser Ser Gly Gly Lys Lys Leu Leu Gly Leu Ser Tyr Asp	
35 40 45	
gag aag cac cag tgg cag cca ata tac gga tca acg ccg gtg acg ccg	192
Glu Lys His Gln Trp Gln Pro Ile Tyr Gly Ser Thr Pro Val Thr Pro	
50 55 60	
acc gga tcg tgg gag atg ggt aag agg tac cac gtg gtt ctt acg atg	240
Thr Gly Ser Trp Glu Met Gly Lys Arg Tyr His Val Val Leu Thr Met	
65 70 75 80	
gcg aat aaa att ggc tcc gtg tac att gat gga gaa cct ctg gag ggt	288
Ala Asn Lys Ile Gly Ser Val Tyr Ile Asp Gly Glu Pro Leu Glu Gly	
85 90 95	
tca ggg cag acc gtt gtg cca gac gag agg acg cct gac atc tcc cac	336
Ser Gly Gln Thr Val Val Pro Asp Glu Arg Thr Pro Asp Ile Ser His	
100 105 110	
ttc tac gtt ggc ggg tat gga agg agt gat atg cca acc ata agc cac	384
Phe Tyr Val Gly Gly Tyr Gly Arg Ser Asp Met Pro Thr Ile Ser His	
115 120 125	
gtg acg gtg aat aat gtt ctt ctt tac aac cgt cag ctg aat gcc gag	432
Val Thr Val Asn Asn Val Leu Leu Tyr Asn Arg Gln Leu Asn Ala Glu	
130 135 140	
gag atc agg acc ttg ttc ttg agc cag gac ctg att ggc acg gaa gca	480
Glu Ile Arg Thr Leu Phe Leu Ser Gln Asp Leu Ile Gly Thr Glu Ala	
145 150 155 160	
cac atg ggc agc agc agc ggc agc agt gcc cac ggt acg ccc tcg att	528
His Met Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Ile	
165 170 175	
ccc gtt gac agc agt gcc cac ggt aca ccc tcg act ccc gtt gac agc	576
Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser	
180 185 190	
agt gcc cac ggt acg ccc tcg act ccc gtt gac agc agt gcc cac ggt	624
Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly	
195 200 205	
aca ccc tcg act ccc gtt gac agc agt gcc cac ggt aca ccc tcg act	672
Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Thr	
210 215 220	
ccc gtt gac agc agt gcc cac ggt aag ccc tcg act ccc gct gac agc	720

Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly Lys Pro Ser Thr Pro Ala Asp Ser
 225 230 235 240

agt gcc cac agt acg ccc tcg act ccc gct gac agc agt gcc cac agt 768
 Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser
 245 250 255

acg ccc tca att ccc gct gac agc agt gcc cac agt acg ccc tca gct 816
 Thr Pro Ser Ile Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Ala
 260 265 270

ccc gct gac aac ggc gcc aat ggt acg gtt ttg att ttg tcg 858
 Pro Ala Asp Asn Gly Ala Asn Gly Thr Val Leu Ile Leu Ser
 275 280 285

<210> 44
 <211> 286
 <212> PRT
 <213> T CRUZI

<400> 44

Asp Pro Thr Tyr Arg Phe Ala Asn His Ala Phe Thr Leu Val Ala Ser
 1 5 10 15

Val Thr Ile His Glu Val Pro Ser Val Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ala
 20 25 30

Ser Leu Asp Ser Ser Gly Gly Lys Lys Leu Leu Gly Leu Ser Tyr Asp
 35 40 45

Glu Lys His Gln Trp Gln Pro Ile Tyr Gly Ser Thr Pro Val Thr Pro
 50 55 60

Thr Gly Ser Trp Glu Met Gly Lys Arg Tyr His Val Val Leu Thr Met
 65 70 75 80

Ala Asn Lys Ile Gly Ser Val Tyr Ile Asp Gly Glu Pro Leu Glu Gly
 85 90 95

Ser Gly Gln Thr Val Val Pro Asp Glu Arg Thr Pro Asp Ile Ser His
 100 105 110

Phe Tyr Val Gly Gly Tyr Gly Arg Ser Asp Met Pro Thr Ile Ser His
 115 120 125

Val Thr Val Asn Asn Val Leu Leu Tyr Asn Arg Gln Leu Asn Ala Glu
 130 135 140

Glu Ile Arg Thr Leu Phe Leu Ser Gln Asp Leu Ile Gly Thr Glu Ala

145				150				155				160			
His	Met	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	His	Gly	Thr	Pro	Ser	Ile
			165						170					175	
Pro	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Gly	Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Val	Asp	Ser
			180						185				190		
Ser	Ala	His	Gly	Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Gly
		195					200						205		
Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Gly	Thr	Pro	Ser	Thr
	210					215					220				
Pro	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Gly	Lys	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Asp	Ser
225					230					235					240
Ser	Ala	His	Ser	Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Ser
				245					250					255	
Thr	Pro	Ser	Ile	Pro	Ala	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Ser	Thr	Pro	Ser	Ala
			260						265				270		
Pro	Ala	Asp	Asn	Gly	Ala	Asn	Gly	Thr	Val	Leu	Ile	Leu	Ser		
		275					280					285			

<210> 45
<211> 701
<212> DNA
<213> T CRUZI

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(699)

```

<400>	45																
act	cat	gac	gcg	tac	agg	ccc	gtt	gat	ccc	tcg	gcg	tac	aag	cgc	gcc	48	
Thr	His	Asp	Ala	Tyr	Arg	Pro	Val	Asp	Pro	Ser	Ala	Tyr	Lys	Arg	Ala		
1				5					10					15			
ttg	ccg	cag	gaa	gag	caa	gag	gat	gtg	ggg	ccg	cgc	cac	gtt	gat	ccc	96	
Leu	Pro	Gln	Glu	Glu	Gln	Glu	Asp	Val	Gly	Pro	Arg	His	Val	Asp	Pro		
			20					25					30				
gac	cac	ttc	cgc	tcg	acc	tcg	acg	act	cat	gac	gcg	tac	agg	ccc	gtt	144	
Asp	His	Phe	Arg	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Tyr	Arg	Pro	Val		
		35					40					45					
gat	ccc	tcg	gcg	tac	aag	cgc	gcc	ttg	ccg	cag	gaa	gag	caa	gag	gat	192	
Asp	Pro	Ser	Ala	Tyr	Lys	Arg	Ala	Leu	Pro	Gln	Glu	Glu	Gln	Glu	Asp		

50	55	60	
gtg ggg ccg cgc cac gtt gat ccc gac cac ttc cgc tcg acg act cat			240
Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Thr His			
65	70	75	80
gac gcg tac agg ccc gtt gat ccc tcg gcg tac aag cgc gcc ttg ccg			288
Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro			
	85	90	95
cag gaa gag caa gag gat gtg ggg ccg cgc cac gtt gat ccc gac cac			336
Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His			
	100	105	110
ttc cgc tcg acc tcg acg act cat gac gcg tac agg ccc gtt gat ccc			384
Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro			
	115	120	125
tcg gcg tac aag cgc gcc ttg ccg cag gaa gag caa gag gat gtg ggg			432
Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly			
	130	135	140
ccg cgc cac gtt gat ccc gac cac ttc cgc tcg acc tcg acg act cat			480
Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His			
	145	150	155
gac gcg tac agg ccc gtt gat ccc tcg gcg tac aag cgc gcc ttg ccg			528
Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro			
	165	170	175
cag gaa gag caa gag gat gtg ggg ccg cgc cac gtt gat ccc gac cac			576
Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His			
	180	185	190
ttc cgc tcg acg act cat gac gcg tac agg ccc gtt gat ccc tcg gcg			624
Phe Arg Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala			
	195	200	205
tac aag cgc gcc ttg ccg cag gaa gag caa gag gat gtg ggg ccg cgc			672
Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg			
	210	215	220
cac gtt gat ccc gac cac ttc cgc tcg ac			701
His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser			
	225	230	

<210> 46
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> T CRUZI

<400> 46

Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro
 20 25 30

Asp His Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val
35 40 45

Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp
50 55 60

Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Thr His
65 70 75 80

Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro
85 90 95

Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His
100 105 110

Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro
115 120 125

Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly
130 135 140

Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His
145 150 155 160

Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro
165 170 175

Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His
180 185 190

Phe Arg Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala
195 200 205

Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg
210 215 220

His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser
225 230

<210> 47
<211> 1557
<212> DNA
<213> T CRUZI

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1557)

<400> 47

gat cca acg tat cgt ttt gca aac cac gcg ttc acg ctg gtg gcg tcg	48
Asp Pro Thr Tyr Arg Phe Ala Asn His Ala Phe Thr Leu Val Ala Ser	
1 5 10 15	
gtg acg att cac gag gtt ccg agc gtc gcg agt cct ttg ctg ggt gcg	96
Val Thr Ile His Glu Val Pro Ser Val Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ala	
20 25 30	
agc ctg gac tct tct ggt ggc aaa aaa ctc ctg ggg ctc tcg tac gac	144
Ser Leu Asp Ser Ser Gly Gly Lys Lys Leu Leu Gly Leu Ser Tyr Asp	
35 40 45	
gag aag cac cag tgg cag cca ata tac gga tca acg ccg gtg acg ccg	192
Glu Lys His Gln Trp Gln Pro Ile Tyr Gly Ser Thr Pro Val Thr Pro	
50 55 60	
acc gga tcg tgg gag atg ggt aag agg tac cac gtg gtt ctt acg atg	240
Thr Gly Ser Trp Glu Met Gly Lys Arg Tyr His Val Val Leu Thr Met	
65 70 75 80	
gcg aat aaa att ggc tcc gtg tac att gat gga gaa cct ctg gag ggt	288
Ala Asn Lys Ile Gly Ser Val Tyr Ile Asp Gly Glu Pro Leu Glu Gly	
85 90 95	
tca ggg cag acc gtt gtg cca gac gag agg acg cct gac atc tcc cac	336
Ser Gly Gln Thr Val Val Pro Asp Glu Arg Thr Pro Asp Ile Ser His	
100 105 110	
ttc tac gtt ggc ggg tat gga agg agt gat atg cca acc ata agc cac	384
Phe Tyr Val Gly Gly Tyr Gly Arg Ser Asp Met Pro Thr Ile Ser His	
115 120 125	
gtg acg gtg aat aat gtt ctt ctt tac aac cgt cag ctg aat gcc gag	432
Val Thr Val Asn Asn Val Leu Leu Tyr Asn Arg Gln Leu Asn Ala Glu	
130 135 140	
gag atc agg acc ttg ttc ttg agc cag gac ctg att ggc acg gaa gca	480
Glu Ile Arg Thr Leu Phe Leu Ser Gln Asp Leu Ile Gly Thr Glu Ala	
145 150 155 160	
cac atg ggc agc agc agc ggc agc agt gcc cac ggt acg ccc tcg att	528
His Met Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Ile	
165 170 175	
ccc gtt gac agc agt gcc cac ggt aca ccc tcg act ccc gtt gac agc	576
Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser	
180 185 190	
agt gcc cac ggt acg ccc tcg act ccc gtt gac agc agt gcc cac ggt	624
Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly	
195 200 205	
aca ccc tcg act ccc gtt gac agc agt gcc cac ggt aca ccc tcg act	672
Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Thr	
210 215 220	

ccc gtt gac agc agt gcc cac ggt aag ccc tcg act ccc gct gac agc Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly Lys Pro Ser Thr Pro Ala Asp Ser 225 230 235 240	720
agt gcc cac agt acg ccc tcg act ccc gct gac agc agt gcc cac agt Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser 245 250 255	768
acg ccc tca att ccc gct gac agc agt gcc cac agt acg ccc tca gct Thr Pro Ser Ile Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Ala 260 265 270	816
ccc gct gac aac ggc gcc aat ggt acg gtt ttg att ttg tcg act cat Pro Ala Asp Asn Gly Ala Asn Gly Thr Val Leu Ile Leu Ser Thr His 275 280 285	864
gac gcg tac agg ccc gtt gat ccc tcg gcg tac aag cgc gcc ttg ccg Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro 290 295 300	912
cag gaa gag caa gag gat gtg ggg ccg cgc cac gtt gat ccc gac cac Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His 305 310 315 320	960
ttc cgc tcg acc tcg acg act cat gac gcg tac agg ccc gtt gat ccc Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro 325 330 335	1008
tcg gcg tac aag cgc gcc ttg ccg cag gaa gag caa gag gat gtg ggg Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly 340 345 350	1056
ccg cgc cac gtt gat ccc gac cac ttc cgc tcg acg act cat gac gcg Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Thr His Asp Ala 355 360 365	1104
tac agg ccc gtt gat ccc tcg gcg tac aag cgc gcc ttg ccg cag gaa Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu 370 375 380	1152
gag caa gag gat gtg ggg ccg cgc cac gtt gat ccc gac cac ttc cgc Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg 385 390 395 400	1200
tcg acc tcg acg act cat gac gcg tac agg ccc gtt gat ccc tcg gcg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala 405 410 415	1248
tac aag cgc gcc ttg ccg cag gaa gag caa gag gat gtg ggg ccg cgc Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg 420 425 430	1296
cac gtt gat ccc gac cac ttc cgc tcg acc tcg acg act cat gac gcg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala 435 440 445	1344
tac agg ccc gtt gat ccc tcg gcg tac aag cgc gcc ttg ccg cag gaa Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu 450 455 460	1392

gag cca gag gac gag ggg ccg cgc cac gtt gat ccc gac cac ttc cgc 1440
 Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg
 465 470 475 480

tcg acg act cat gac gcg tac agg ccc gtt gat ccc tcg gcg tac aag 1488
 Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys
 485 490 495

cgc gcc ttg ccg cag gaa gag caa gag gat gtg ggg ccg cgc cac gtt 1536
 Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val
 500 505 510

gat ccc gac cac ttc cgc tcg 1557
 Asp Pro Asp His Phe Arg Ser
 515

<210> 48
 <211> 519
 <212> PRT
 <213> T CRUZI

<400> 48

Asp Pro Thr Tyr Arg Phe Ala Asn His Ala Phe Thr Leu Val Ala Ser
 1 5 10 15

Val Thr Ile His Glu Val Pro Ser Val Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ala
 20 25 30

Ser Leu Asp Ser Ser Gly Gly Lys Lys Leu Leu Gly Leu Ser Tyr Asp
 35 40 45

Glu Lys His Gln Trp Gln Pro Ile Tyr Gly Ser Thr Pro Val Thr Pro
 50 55 60

Thr Gly Ser Trp Glu Met Gly Lys Arg Tyr His Val Val Leu Thr Met
 65 70 75 80

Ala Asn Lys Ile Gly Ser Val Tyr Ile Asp Gly Glu Pro Leu Glu Gly
 85 90 95

Ser Gly Gln Thr Val Val Pro Asp Glu Arg Thr Pro Asp Ile Ser His
 100 105 110

Phe Tyr Val Gly Gly Tyr Gly Arg Ser Asp Met Pro Thr Ile Ser His
 115 120 125

Val Thr Val Asn Asn Val Leu Leu Tyr Asn Arg Gln Leu Asn Ala Glu
 130 135 140

Glu Ile Arg Thr Leu Phe Leu Ser Gln Asp Leu Ile Gly Thr Glu Ala
145 150 155 160

His Met Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Ile
165 170 175

Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser
180 185 190

Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly
195 200 205

Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Thr
210 215 220

Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly Lys Pro Ser Thr Pro Ala Asp Ser
225 230 235 240

Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser
245 250 255

Thr Pro Ser Ile Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Ala
260 265 270

Pro Ala Asp Asn Gly Ala Asn Gly Thr Val Leu Ile Leu Ser Thr His
275 280 285

Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro
290 295 300

Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His
305 310 315 320

Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro
325 330 335

Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly
340 345 350

Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Thr His Asp Ala
355 360 365

Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu
370 375 380

Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg
385 390 395 400

Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala
405 410 415

Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg
420 425 430

His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala
435 440 445

Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu
450 455 460

Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg
465 470 475 480

Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys
485 490 495

Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val
500 505 510

Asp Pro Asp His Phe Arg Ser
515

<210> 49
<211> 1521
<212> DNA
<213> T CRUZI

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1521)

<400> 49
atg gcc cga gct gtg gtg ctt gag gat gga gcg ctt tac gtg gcg gac 48
Met Ala Arg Ala Val Val Leu Glu Asp Gly Ala Leu Tyr Val Ala Asp
1 5 10 15

aat gcc aac aac ctc gtt cga gaa atc tcc aat ggc gtt gtc act tcg 96
Asn Ala Asn Asn Leu Val Arg Glu Ile Ser Asn Gly Val Val Thr Ser
20 25 30

ttt att acg gaa gga ctg ctg ggc cca tcg tac atc aaa ccg tac agc 144
Phe Ile Thr Glu Gly Leu Leu Gly Pro Ser Tyr Ile Lys Pro Tyr Ser
35 40 45

cgt aca aat ggc gct cat gac ttg ttt gtg tcg gac acg ggc aaa tca 192

Arg	Thr	Asn	Gly	Ala	His	Asp	Leu	Phe	Val	Ser	Asp	Thr	Gly	Lys	Ser	
50						55					60					
cgc	atc	att	ttt	gcc	cca	cct	cag	aaa	aaa	acg	ttc	atc	aca	gtg	ttt	240
Arg	Ile	Ile	Phe	Ala	Pro	Pro	Gln	Lys	Lys	Thr	Phe	Ile	Thr	Val	Phe	
65					70					75					80	
ata	aca	gga	ttc	cag	cog	gat	gtt	ctt	caa	att	agc	gag	aag	agt	cgt	288
Ile	Thr	Gly	Phe	Gln	Pro	Asp	Val	Leu	Gln	Ile	Ser	Glu	Lys	Ser	Arg	
				85					90					95		
ttg	atg	ttt	gcc	atc	tgc	aat	tcc	acg	aaa	att	ctt	gcg	att	aat	atg	336
Leu	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	Asn	Ser	Thr	Lys	Ile	Leu	Ala	Ile	Asn	Met	
			100					105					110			
cag	gga	gcc	aca	acc	ccg	aag	gag	tac	tgg	caa	gtt	gga	aat	gog	gac	384
Gln	Gly	Ala	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Tyr	Trp	Gln	Val	Gly	Asn	Ala	Asp	
			115				120					125				
tgc	atg	ggc	tat	cag	agt	tcc	ctc	atg	ctc	acg	acc	gag	gag	gat	aaa	432
Cys	Met	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Leu	Met	Leu	Thr	Thr	Glu	Glu	Asp	Lys	
			130			135					140					
ctc	ctc	tac	tac	ggc	ata	tta	aat	gga	acc	cca	tcc	atc	atg	tct	tta	480
Leu	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Leu	Asn	Gly	Thr	Pro	Ser	Ile	Met	Ser	Leu	
				145		150				155					160	
ccc	gcc	acc	aaa	acg	aag	acg	gaa	gca	ccc	aga	att	tgc	ccg	gat	gtg	528
Pro	Ala	Thr	Lys	Thr	Lys	Thr	Glu	Ala	Pro	Arg	Ile	Cys	Pro	Asp	Val	
				165					170					175		
ttg	ttg	cag	tgg	cca	cat	ggg	ccc	att	gtt	tcg	ctt	gtg	aat	att	aac	576
Leu	Leu	Gln	Trp	Pro	His	Gly	Pro	Ile	Val	Ser	Leu	Val	Asn	Ile	Asn	
			180				185						190			
aaa	cat	gca	ttt	tac	gtt	gtt	acc	gcc	tcc	aat	gta	tac	att	gta	cat	624
Lys	His	Ala	Phe	Tyr	Val	Val	Thr	Ala	Ser	Asn	Val	Tyr	Ile	Val	His	
			195				200					205				
gat	ggc	tcg	tat	cat	ccg	act	gga	tcc	atg	gcc	cag	ctc	caa	cag	gca	672
Asp	Gly	Ser	Tyr	His	Pro	Thr	Gly	Ser	Met	Ala	Gln	Leu	Gln	Gln	Ala	
			210			215					220					
gaa	aat	aat	atc	act	aat	tcc	aaa	aaa	gaa	atg	aca	aag	cta	cga	gaa	720
Glu	Asn	Asn	Ile	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys	Glu	Met	Thr	Lys	Leu	Arg	Glu	
					230				235						240	
aaa	gtg	aaa	aag	gcc	gag	aaa	gaa	aaa	ttg	gac	gcc	att	aac	cgg	gca	768
Lys	Val	Lys	Lys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Leu	Asp	Ala	Ile	Asn	Arg	Ala	
				245					250					255		
acc	aag	ctg	gaa	gag	gaa	cga	aac	caa	gcg	tac	aaa	gca	gca	cac	aag	816
Thr	Lys	Leu	Glu	Glu	Glu	Arg	Asn	Gln	Ala	Tyr	Lys	Ala	Ala	His	Lys	
				260			265						270			
gca	gag	gag	gaa	aag	gct	aaa	aca	ttt	caa	cgc	ctt	ata	aca	ttt	gag	864
Ala	Glu	Glu	Glu	Lys	Ala	Lys	Thr	Phe	Gln	Arg	Leu	Ile	Thr	Phe	Glu	
				275			280					285				
tcg	gaa	aat	att	aac	tta	aag	aaa	agg	cca	aat	gac	gca	gtt	tca	aat	912

Ser	Glu	Asn	Ile	Asn	Leu	Lys	Lys	Arg	Pro	Asn	Asp	Ala	Val	Ser	Asn		
290						295				300							
cg	g	a	a	a	a	t	t	g	a	a	a	a	g	a	a	g	g
Arg	Asp	Lys	Lys	Lys	Asn	Ser	Glu	Thr	Ala	Lys	Thr	Asp	Glu	Val	Glu		960
305					310					315					320		
a	a	c	a	g	g	c	g	g	c	a	g	a	c	g	a	a	c
Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln		1008
				325					330					335			
a	g	g	c	a	a	c	a	a	g	g	t	t	g	c	a	a	a
Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Arg	Lys	Ala		1056
			340					345					350				
g	c	t	g	a	g	c	c	a	a	g	c	a	a	g	c	a	a
Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu		1104
	355						360					365					
g	c	c	a	a	g	c	a	a	a	g	c	a	g	c	t	g	a
Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala		1152
	370					375				380							
a	a	g	c	c	t	g	a	a	g	c	a	g	c	a	a	g	t
Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val		1200
385					390				395					400			
g	c	c	a	a	g	c	a	a	g	c	a	g	c	t	g	a	a
Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Met	Lys	Val	Ala	Glu		1248
			405					410					415				
g	c	g	a	a	g	c	a	g	c	c	a	a	g	c	c	t	g
Ala	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu		1296
		420					425					430					
a	a	c	a	g	g	c	a	g	c	t	g	a	a	g	c	a	a
Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln		1344
	435						440					445					
a	a	g	c	a	g	c	c	a	a	g	c	c	t	g	a	a	a
Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala		1392
	450					455					460						
g	c	t	g	a	a	g	c	c	a	a	g	c	a	a	g	c	a
Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Ala	Glu		1440
	465				470				475				480				
g	c	c	a	a	g	c	c	t	g	a	a	g	c	c	a	a	a
Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr		1488
			485				490						495				
a	a	g	t	t	g	c	a	a	g	c	a	g	c	a	a	g	t
Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Asp	Ile	Asp	Pro							1521
		500						505									

<210> 50
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> T CRUXI

<400> 50

Met Ala Arg Ala Val Val Leu Glu Asp Gly Ala Leu Tyr Val Ala Asp
 1 5 10 15

Asn Ala Asn Asn Leu Val Arg Glu Ile Ser Asn Gly Val Val Thr Ser
 20 25 30

Phe Ile Thr Glu Gly Leu Leu Gly Pro Ser Tyr Ile Lys Pro Tyr Ser
 35 40 45

Arg Thr Asn Gly Ala His Asp Leu Phe Val Ser Asp Thr Gly Lys Ser
 50 55 60

Arg Ile Ile Phe Ala Pro Pro Gln Lys Lys Thr Phe Ile Thr Val Phe
 65 70 75 80

Ile Thr Gly Phe Gln Pro Asp Val Leu Gln Ile Ser Glu Lys Ser Arg
 85 90 95

Leu Met Phe Ala Ile Cys Asn Ser Thr Lys Ile Leu Ala Ile Asn Met
 100 105 110

Gln Gly Ala Thr Thr Pro Lys Glu Tyr Trp Gln Val Gly Asn Ala Asp
 115 120 125

Cys Met Gly Tyr Gln Ser Ser Leu Met Leu Thr Thr Glu Glu Asp Lys
 130 135 140

Leu Leu Tyr Tyr Gly Ile Leu Asn Gly Thr Pro Ser Ile Met Ser Leu
 145 150 155 160

Pro Ala Thr Lys Thr Lys Thr Glu Ala Pro Arg Ile Cys Pro Asp Val
 165 170 175

Leu Leu Gln Trp Pro His Gly Pro Ile Val Ser Leu Val Asn Ile Asn
 180 185 190

Lys His Ala Phe Tyr Val Val Thr Ala Ser Asn Val Tyr Ile Val His
 195 200 205

Asp Gly Ser Tyr His Pro Thr Gly Ser Met Ala Gln Leu Gln Gln Ala
 210 215 220

Glu Asn Asn Ile Thr Asn Ser Lys Lys Glu Met Thr Lys Leu Arg Glu
 225 230 235 240

70

Lys Val Lys Lys Ala Glu Lys Glu Lys Leu Asp Ala Ile Asn Arg Ala
245 250 255

Thr Lys Leu Glu Glu Glu Arg Asn Gln Ala Tyr Lys Ala Ala His Lys
260 265 270

Ala Glu Glu Glu Lys Ala Lys Thr Phe Gln Arg Leu Ile Thr Phe Glu
275 280 285

Ser Glu Asn Ile Asn Leu Lys Lys Arg Pro Asn Asp Ala Val Ser Asn
290 295 300

Arg Asp Lys Lys Lys Asn Ser Glu Thr Ala Lys Thr Asp Glu Val Glu
305 310 315 320

Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln
325 330 335

Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Arg Lys Ala
340 345 350

Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu
355 360 365

Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val
385 390 395 400

Ala Glu Ala Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Met Lys Val Ala Glu
405 410 415

Ala Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu
420 425 430

Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln
435 440 445

Lys Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln Arg Ala
450 455 460

Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu
465 470 475 480

WO 2004/050852

PCT/US2003/038458

Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr
485 490 495

Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Asp Ile Asp Pro
500 505

**POLIPÉPTIDOS RECOMBINANTES PARA DIAGNOSTICAR LA INFECCIÓN
CON EL TRYPANOSOMA CRUZI**

72

Esta solicitud reclama prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/430.654, presentada el 4 de Diciembre del 2002, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] 1. Área de la invención.

[0002] La presente invención se refiere a polipéptidos recombinantes útiles para diagnosticar la tripanosomiasis americana, o enfermedad de Chagas. La enfermedad de Chagas es causada por el agente infeccioso llamado *Trypanosoma cruzi*. De forma más particular, la invención se refiere a: combinaciones específicas de polipéptidos recombinantes del *T. cruzi*, sintetizados utilizando técnicas de ingeniería genética; construcciones y procesos para la producción de los polipéptidos recombinantes; y un ensayo y un kit para detectar la infección con el *T. cruzi* que utilizan los polipéptidos recombinantes.

[0003] 2. Antecedentes

**POLIPÉPTIDOS RECOMBINANTES PARA DIAGNOSTICAR LA INFECCIÓN
CON EL TRYPANOSOMA CRUZI**

73

Esta solicitud reclama prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/430.654, presentada el 4 de Diciembre del 2002, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] 1. Área de la invención.

[0002] La presente invención se refiere a polipéptidos recombinantes útiles para diagnosticar la tripanosomiasis americana, o enfermedad de Chagas. La enfermedad de Chagas es causada por el agente infeccioso llamado *Trypanosoma cruzi*. De forma más particular, la invención se refiere a: combinaciones específicas de polipéptidos recombinantes del *T. cruzi*, sintetizados utilizando técnicas de ingeniería genética; construcciones y procesos para la producción de los polipéptidos recombinantes; y un ensayo y un kit para detectar la infección con el *T. cruzi* que utilizan los polipéptidos recombinantes.

[0003] 2. Antecedentes

[0004] La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por el parásito protozoario, *Trypanosoma cruzi*. Este organismo es transmitido primariamente por contacto con sus vectores insectos, pero también la transmisión por transfusión de sangre contaminada y la transmisión congénita son importantes. Históricamente la enfermedad de Chagas ha sido un problema de salud pública en toda la América Latina, con la excepción de las naciones caribeñas. La Organización Mundial de Salud ha estimado que 16-18 millones de personas están crónicamente infectadas con el *T. cruzi*, y que cada año ocurren 45.000 muertes relacionadas al padecimiento. La infección por el *T. cruzi* dura toda la vida y los medicamentos específicos para el tratamiento carecen de efectividad y a menudo causan graves efectos colaterales. Diez a treinta por ciento de las personas infectadas con el *T. cruzi* desarrollan la enfermedad de Chagas crónica sintomática y el impacto de la invalidez y la mortalidad en los países endémicos es enorme.

[0005] Se estima que 80.000 a 100.000 personas infectadas actualmente viven en los Estados Unidos. Estos inmigrantes crean un riesgo de transmisión del parásito por transfusión aquí y en los otros países donde los latinoamericanos han emigrado. Ocho casos de este tipo se han reportado en los Estados Unidos, Canadá, y Europa, de los cuales todos ocurrieron en pacientes inmunosuprimidos en quienes la infección aguda por el *T. cruzi* fue diagnosticado debido al curso fulminante de la enfermedad. La mayoría de las transfusiones se proporcionan a pacientes inmunocompetentes en quienes la enfermedad de Chagas sería un padecimiento moderado, y de esta manera es razonable deducir que muchos otros casos no detectados de transmisión del *T. cruzi* asociados a la transfusión habrán ocurrido en los Estados Unidos y en las otras naciones

75
industrializadas. La cuestión de si la sangre donada en los Estados Unidos debe de tamizarse serológicamente para anticuerpos al *T. cruzi* se ha considerado durante por lo menos una década por las entidades públicas y privadas que están involucradas en bancos de sangre. Un panel de expertos convocados en los primeros meses del 2002 por la Cruz Roja Americana para considerar esta cuestión recomendó unánimemente que nuestra sangre donada se tamizase serológicamente. La implementación de tal recomendación, sin embargo, no es una opción en este momento porque ninguna prueba para la infección con el *T. cruzi* se ha aprobado por la FDA para tamizar sangre donada.

[0006] El diagnóstico de infección con el *T. cruzi* presenta problemas. Los datos demográficos y clínicos cuando mucho solo son sugestivos. Pruebas parasitológicas, así como xenodiagnosis, hemocultivo y PCR son insensibles. Otras pruebas serológicas generalmente son insensibles y carecen de especificidad, de manera que reacciones falso-positivas ocurren a menudo con especímenes de pacientes con enfermedades infecciosas, tales como leishmaniasis, sífilis, o paludismo; enfermedades autoinmunes; y otros padecimientos parasitarios y no parasitarios.

[0007] Tales pruebas convencionales incluyen las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta (HAI), y fijación de complemento (FC), así como los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA o EIA). Debido a la falta de sensibilidad y especificidad de las tres pruebas comúnmente empleadas, cuando una muestra da un resultado positivo en alguna de ellas, la sangre tiene que descartarse.

La Tabla I muestra que hasta 3,43% de las donaciones de sangre se incluyeron en esta categoría en un importante banco de sangre brasileño (Hemocentro, São Paulo, Brasil).

IFI	HAI	FC	% c/ Resultados
+	+	+	0.68%
+	-	+	0.71%
+	+	-	
-	+	+	
+	-	-	2.04%
-	+	-	
-	-	+	
TOTAL:			3.43%

TABLA I

[0008] ELISAs comercialmente disponibles incluyen pruebas como por ejemplo el Enzima-Immunoensayo (EIA), disponible de Laboratorios Abbott de Abbott Park, Illinois (el sujeto de la Notificación Pre-mercado 510(k) de la FDA No. K933716, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad); el ELISA IgG Chagas, disponible de Biociencias Meridian, S.A., de Cincinnati, Ohio, y su predecesor, Laboratorios Gull (el sujeto de la Notificación Pre-mercado 510(k) de la FDA No. K911233, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad); y la Prueba Chagas (método EIA), disponible de Diagnósticos Hemagen, S.A., de Waltham, Massachusetts (el sujeto de la Notificación Pre-mercado 510(k) de la FDA No. K930272, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad). Sin embargo, debido a que estas pruebas tienen sensibilidades y especificidades no óptimas, su empleo para tamizar sangre donada fallaría en detectar algunas unidades infectadas con el *T. cruzi* y también resultaría en que se descarten sin necesidad cantidades sustanciales de unidades de otra manera aprovechables.

22

[0009] Uno de los presentes inventores ha desarrollado previamente un ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA), descrito en Kirchhoff LV, Gam AA, Gusmao RD, Goldsmith RS, Rezende JM, Rassi A. "Especificidad incrementada del serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas por detección de anticuerpos a las glicoproteínas de 72 y 90 kDa del *Trypanosoma cruzi*." J Infect Dis 1987;155:561-564, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad. Este ensayo se considera la prueba de oro con que otras pruebas se miden, y actualmente es la única opción para el diagnóstico confirmatorio en los Estados Unidos. Desafortunadamente, el RIPA cuesta US\$175 por ensayo, y a ese precio, tamizar las aproximadamente 13 millones de unidades donadas cada año costaría más de US\$2.000 millones.

[0010] Por lo tanto, los presentes inventores han desarrollado más allá ensayos recombinantes para la detección de infección con el *T. cruzi*. Un polipéptido recombinante típico y un método para ensayar se describen por ellos en la Patente de los Estados Unidos No. 5.876.734, No. 6.228.601, y la Publicación PCT No. WO 95/25797, cada una de las cuales aquí dentro es incorporado por referencia en su totalidad. Tales ensayos para la infección con el *T. cruzi* basados en antígenos recombinantes, contrastando con los que utilizan antígenos nativos (e.g., los ensayos convencionales basados en lisados), como se discutieron arriba, serán más exactos, i.e., la sensibilidad y la especificidad serán más altas.

[0011] Además, los ensayos recombinantes de la invención presentan ventajas de manufactura sobre los materiales para el RIPA y las pruebas convencionales. Una vez

38

que la biología molecular se ha llevado a cabo, los antígenos recombinantes se producen en *Escherichia coli*, así eliminando completamente cualquier biopeligro asociado a la producción de los parásitos en medio de cultivo. Esta es una ventaja sustancial porque se han reportado muchos casos de infección con el *T. cruzi* adquiridos en el laboratorio. Adicionalmente, los antígenos recombinantes producidos en *E. coli* son más fáciles de purificar, cuantificar, y estandarizar que antígenos lisados producidos en cultivos líquidos de parásitos, de esta manera facilitando la manufactura de un producto consistente y simplificando el cumplimiento con el reglamento gubernamental. Una ventaja final se encuentra en el hecho de que varias de las proteínas recombinantes presentadas en esta solicitud son constituidas por dos a cuatro segmentos proteicos distintos derivados de genes separados del *T. cruzi*. Este empleo de proteínas híbridas recombinantes también facilita la manufactura de un ensayo en que varias proteínas antigénicamente distintas se obtienen en una corrida única de purificación, cuantificación, y estandarización.

RESUMEN DE LA INVENCION.

[0012] La presente invención utiliza proteínas recombinantes para detectar sangre infectada con el *T. cruzi*. La invención utiliza secuencias polipeptídicas específicas que corresponden a las proteínas de fusión FP3, FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9 y FP10 como se describen abajo. Polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos inventivos de acuerdo a la presente invención también se utilizan, así como células transformadas por un plásmido recombinante que expresa un polipéptido de acuerdo a la invención. La presente invención es semejante a la que está descrita en la Patente de los Estados Unidos

No. 5.876.734, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad. Sin embargo, la presente invención reemplaza las proteínas en el proceso con las proteínas de esta invención para obtener resultados similares o superiores.

[0013] La presente invención también provee un método para detectar la presencia de anticuerpos contra el *T. cruzi* en un individuo, comprendiendo los pasos de hacer contactar una muestra de un individuo que putativamente contiene anticuerpos contra el *T. cruzi* con un polipéptido de acuerdo a la invención que típicamente está acoplado o conjugado a una molécula portadora o acoplado o conjugado a una fase sólida; permitiendo anticuerpos anti-*T. cruzi* y otros a ligarse a dicho polipéptido; removiendo por lavado anticuerpos anti-*T. cruzi* no acoplados; y agrediendo un compuesto que permite la detección de los anticuerpos que están específicamente acoplados al polipéptido. El compuesto que permite detección de los anticuerpos anti-*T. cruzi* puede ser escogido del grupo que consiste en un agente colorimétrico, un agente fluorescente, un agente quimioluminescente y un radionucleótido.

[0014] También previsto de acuerdo a la presente invención es un kit para diagnosticar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en una muestra, consistiendo en un recipiente en que un polipéptido de acuerdo a la invención está acoplado o conjugado a una molécula portadora o acoplado o conjugado a una fase sólida; e instrucciones para llevar a cabo el método de acuerdo a la invención. El kit adicionalmente puede consistir en un recipiente de un compuesto que se acopla a anticuerpos anti-*T. cruzi* y que deja tales anticuerpos detectables.

[0015] Otros propósitos, características, y ventajas de la presente invención llegarán a ser aparentes en la siguiente descripción detallada. Debe de entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, mientras indican incorporaciones preferidas de la invención, se presentan solamente con fines de ilustración, debido a que varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y del rango de la invención llegarán a ser aparentes de esta descripción detallada a personas capacitadas en el arte.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0016] Fig. 1 es una descripción del arte previo.

[0017] Fig 1a-1h son representaciones esquemáticas de las proteínas recombinantes utilizadas en la invención.

[0018] Fig. 2 es una gráfica de barras que muestra la reactividad de varios especímenes con proteínas recombinantes utilizadas individualmente o en combinación como antígenos blanco en ELISAs.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0019] Las Figuras 1a-1h representan las proteínas recombinantes de la invención, con las diferentes letras indicando secuencias conocidas, a seguir. Las Figuras son diagramas

de las proteínas recombinantes del *T. cruzi*, constituidas por los segmentos desde la A hasta la L. Los segmentos sólidos (A, C, D, F, H, I, y K) representan proteínas no repetitivas que tienen secuencias de aminoácidos que no están relacionados una a la otra. Los segmentos en forma de sierra (B, E, G, J, y L) representan proteínas repetitivas que tienen secuencias que no están relacionadas una a la otra y no están relacionadas a las de las proteínas no repetitivas. Los tamaños relativos y los números de los subsegmentos repetidos en las proteínas repetitivas se representan aproximadamente en las Figuras. Los tamaños y las formas de los segmentos no repetitivos no tienen ninguna relación a las proteínas actuales.

[0020] La siguiente información se refiere a las Figuras 1a-1h en que las proteínas recombinantes Ag15, FP3, FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9, y FP10 se dibujan esquemáticamente. Estas proteínas son derivadas del *T. cruzi*, el parásito protozoario que causa la enfermedad de Chagas, y son formados por las proteínas desde la A hasta la L como están señaladas, y definidas aquí. No hay semejanzas sustanciales de aminoácidos entre las proteínas desde la A hasta la L. Similarmente no hay semejanzas sustanciales de secuencias de ADN entre los segmentos que codifican las proteínas desde la A hasta la L. Las secuencias del *T. cruzi* que codifican las proteínas desde la A hasta la L fueron clonados en combinación dentro de plásmidos vehículos pGEX y pET, tales como pET-32a. Cepas de *Escherichia coli* fueron transfectado con los vectores recombinantes que llevaban las secuencias de ADN del *T. cruzi*, y las bacterias fueron incubado en medio líquido de cultivo bajo condiciones que favorecían la síntesis de proteínas recombinantes. Estas proteínas subsecuentemente fueron purificado por afinidad y

después utilizado como blanco en ELISAs. ELISAs en que las proteínas Ag15, FP3, FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9, y FP10, solas o en combinación se emplean como antígenos blanco son útiles como detectores sensibles y específicos de anticuerpos anti-*T. cruzi* en especímenes obtenidos de personas que están crónicamente infectadas con este parásito. La detección de tales anticuerpos es el método primario de identificar personas que están crónicamente infectadas con el *T. cruzi*.

[0021] Los siguientes párrafos contienen información que se refiere al nombramiento, localización, y función de las proteínas desde la A hasta la L, así como los correspondientes números de accesoión de GenBank de las secuencias a las cuales se relatan y publicaciones pertinentes.

[0022] Debe de notarse que los segmentos de genes del *T. cruzi* que codifican los segmentos desde la A hasta la L generalmente son versiones acortadas de las regiones codificantes nativas. En este contexto, las construcciones que codifican solo un segmento (i.e., FP5 y FP9), así como todas las otras que codifican más de un segmento, todas son únicas, porque, aun si son conocidos los componentes individuales de los cuales las varias proteínas recombinantes de esta invención son derivadas, los segmentos de la invención no se han combinado previamente en la manera descrita aquí dentro.

[0023] Proteína AB. Esta proteína recombinante híbrida, también designada Ag15 [SEQ ID NO. 2] en la Figura 1, es derivado del gen TCR27 del *T. cruzi* [SEQ ID NO. 1]. La Proteína A es la porción no repetitiva del término N de la proteína TCR27, y la

Proteína B es comprendida por aproximadamente 18 de los subsegmentos de 14 aminoácidos que constituyen la porción central de la proteína TCR27. Los dos genes TCR27 nativos secuenciados contenían aproximadamente 69 y 104 de los subsegmentos repetidos de 14 aminoácidos.

[0024] Datos de secuencia de nucleótidos que incluyen la secuencia de ADN de Ag15 fueron depositado en las bases de datos de GenBank y EMBL por Keiko Otsu, John E. Donelson, y Louis V. Kirchhoff con el número de accesoión L04603 y se describen en las Patentes de los Estados Unidos No. 5.876.734 y No. 6.228.601, expedidas a Louis V. Kirchhoff y Keiko Otsu (cada una de las cuales se incorpora en su totalidad aquí dentro por referencia). Estas referencias también presentan secuencias de ADN y de proteínas deducidas que incluyen las secuencias de ADN y de la proteína deducida de Ag15. Las secuencias de ADN y de proteína deducida de Ag15 son adicionalmente presentadas en Otsu K, Donelson JE, Kirchhoff LV. "Interrupción de un gen de *Trypanosoma cruzi* que codifica una proteína que contiene subsegmentos repetidos de 14 aminoácidos por inserción del gen de fosfotransferasa de neomicina." Mol Biochem Parasitol 1993;57:317-330, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad.

[0025] Proteína C. Esta es una proteína del *T. cruzi* que se acopla al calcio, inicialmente llamada 1F8 y más tarde designada la proteína flagelar que se acopla al calcio (FCaBP) [SEQ ID NO 4]. El número de accesoión de la secuencia original de ADN de 1F8 [SEQ ID NO 3] depositada en GenBank es K03278. Las secuencias de ADN y de la proteína deducida de la Proteína C se presentan en Gonzalez A, Lerner TJ, Huecas M,

Sosa-Pineda B, Nogueira N, Lizardi PM. "Generación aparente de un ARNm segmentado de dos familias de genes, una delante de la otra, del *Trypanosoma cruzi*." Nucleic Acids Res 1985;13(16):5789-804, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad.

[0026] Fig. 1a muestra una primera proteína (FP3) [SEQ ID NO. 22] de acuerdo a la invención. Específicamente, FP3 corresponde esencialmente a la combinación de Ag15 (Fig. 1), y la Proteína C. La secuencia de ADN que codifica FP3 [SEQ ID NO. 21], también esencialmente corresponde a las secuencias que codifican Ag15 y la Proteína C.

[0027] Proteína D. Esto es el núcleo protéico de una glicoproteína de la superficie del *T. cruzi* referido GP72 [SEQ ID NO. 6]. El número de accesoión de la secuencia original de ADN de la gp72 [SEQ ID NO. 5] depositado en GenBank es M65021. Las secuencias de ADN y de la proteína deducida de la Proteína D se presentan en Cooper R, Inverso JA, Espinosa M, Nogueira N, Cross GA. "Caracterización de un gen candidato del GP72, un antígeno específico del estadio del insecto del *Trypanosoma cruzi*". Mol Biochem Parasitol 1991;49(1):45-59, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad.

[0028] Fig. 1b muestra una segunda proteína (FP4) [SEQ ID NO. 8] de acuerdo a la invención. La secuencia de ADN [SEQ ID NO. 7] que codifica la Proteína DABC que es una región codificante continua única, corresponde esencialmente a las secuencias de ADN de las cuales fue construido.

85

[0029] Proteína E. Esta es un segmento de la proteína repetitiva flagelar (FRA) [SEQ ID NO. 10] del *T. cruzi* compuesto de aproximadamente nueve subsegmentos repetidos, cada una de las cuales consiste en 68 aminoácidos, mostrada como Fig. 1c (FP5). El número de acceso de la secuencia original de ADN de la Proteína E depositado en GenBank es J04015. Las secuencias de ADN y de la proteína deducida se presentan en Lafaille JJ, Linss J, Krieger MA, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S. "Estructura y expresión de dos genes de *Trypanosoma cruzi* que codifican proteínas antigénicas que llevan epítopes repetidos." Mol Biochem Parasitol 1989;35(2):127-136, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad.

[0030] Proteína FGH. Esta es una proteína [SEQ ID NO. 12] codificada por una versión modificada del gen TCR39 del *T. cruzi* que fue construido artificialmente [SEQ ID NO. 11], mostrada como Fig. 1e (FP7). La modificación ocasionó la reducción de la longitud de la porción central del gen TCR39 que codifica los subsegmentos repetidos de 12 aminoácidos. La Proteína F es el segmento no repetitivo del término N de la proteína TCR39. La Proteína G es comprendida por aproximadamente 13 de los subsegmentos repetidos de 12 aminoácidos que constituyen la porción central de la proteína TCR39. La Proteína H es el segmento no repetitivo del término C de la proteína TCR39. El número de acceso de la secuencia original de ADN, i.e., no modificada, de la Proteína FGH depositada en GenBank es U15616. Las secuencias TCR39 de ADN y de la proteína deducida, que incluyen las secuencias de la Proteína FGH en su totalidad, se presentan en Gruber A, Zingales B. "*Trypanosoma cruzi*: caracterización de dos antígenos

recombinantes con aplicación potencial al diagnóstico de la enfermedad de Chagas." Exp Parasitol 1993;76(1):1-12, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad.

[0031] La Fig. 1d presenta otra proteína recombinante híbrida (FP6, Proteína FGHE) [SEQ ID NO. 14] de acuerdo a la invención. La secuencia de ADN que codifica la Proteína FGHE [SEQ ID NO. 13], que es una región única continua codificante, esencialmente corresponde a las secuencias de ADN de las cuales fue construido.

[0032] Protein IJK. Esta es una proteína [SEQ ID NO. 16] codificada por una versión modificada del gen del antígeno desprendido de la fase aguda del *T. cruzi* (SAPA) que fue construido artificialmente [SEQ ID NO. 15], así representada en la Fig. 1f (FP8). La modificación ocasionó la reducción de la longitud de la porción central del gen SAPA que es comprendida por subsegmentos repetidos de 12 aminoácidos. La Proteína I es el segmento no repetitivo del término N de la proteína SAPA. La Proteína J es comprendida por aproximadamente nueve de los subsegmentos repetidos de 12 aminoácidos que constituyen la porción central de la proteína SAPA. La Proteína K es el segmento no repetitivo del término C de la proteína SAPA. El número de accesoión de la secuencia original de ADN, i.e., no modificada, de la Proteína IJK depositada en GenBank es J03985. Las secuencias SAPA de ADN y de la proteína, que incluyen en su totalidad las secuencias de la Proteína IJK, se presentan en Affranchino JL, Pollevick GD, Frasch ACC. "La expresión del antígeno mayor desprendido del *Trypanosoma cruzi* resulta de la transcripción regulada por desarrollo de una familia

pequeña de genes." FEBS Lett 1991;280:316-320, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad.

[0033] Proteína L. Esta es una proteína repetitiva asociada a microtubos (MAP) [SEQ ID NO. 18] del *T. cruzi* que es comprendida por aproximadamente cinco subsegmentos repetidos constituidos por 38 aminoácidos cada uno, mostrada en la Fig. 1g (FP9). El número de accesoión de la secuencia original de ADN de la Proteína L [SEQ ID NO. 17] depositada en GenBank es S68286. Las secuencias de ADN y de las proteínas deducidas de la Proteína L se presentan en Kerner N, Liegeard P, Levin MJ, Hontebeyrie-Joskowicz M. "*Trypanosoma cruzi*: anticuerpos a una proteína semejante a MAP en la enfermedad de Chagas crónica tienen reacciones cruzadas con el citoesqueleto de mamíferos." Experimental Parasitology 1991;73(4):451-459, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad.

[0034] La Fig. 1h presenta otra proteína recombinante híbrida (FP10, Proteína IJL) [SEQ ID NO. 20] de acuerdo a la invención. La secuencia de ADN que codifica la Proteína IJL [SEQ ID NO. 19], esencialmente corresponde a las secuencias de ADN de las cuales fue construido.

[0035] Adicionalmente, combinaciones de las varias proteínas recombinantes dibujadas en las Figs. pueden ser utilizadas. Mientras es posible combinar una o más de las proteínas recombinantes con el propósito de formar proteínas recombinantes más largas, típicamente más de una proteína recombinante se utiliza simultáneamente. Por ejemplo,

el empleo simultáneo de FP4 y FP5, FP5 y FP6, así como de FP4 y FP6, y combinaciones utilizando más de dos proteínas recombinantes (e.g., FP4, FP6 y FP10) se consideran dentro del alcance de la presente invención. Se cree que la sensibilidad y la especificidad de los ensayos de acuerdo a la invención son suficientes para cumplir con los estándares de la FDA para tamizar la sangre donada en los Estados Unidos.

[0036] Adicionalmente, como descrito en la Patente No. 6.228.601 de los Estados Unidos (aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad), los polipéptidos no necesitan corresponder exactamente en todas sus longitudes para ser consideradas dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, una variedad amplia de polipéptidos que contienen por lo menos un epítipo incorporado en los polipéptidos de la invención puede ser utilizada de acuerdo a la presente invención. Basadas en las secuencias de nucleótidos, moléculas de polipéptidos también pueden producirse (1) que incluyen variaciones de secuencias, relativas a las secuencias que ocurren naturalmente, (2) que tienen uno o más aminoácidos truncados de las secuencias que ocurren naturalmente o variaciones de ellas, o (3) que contienen las secuencias que ocurren naturalmente y variaciones de ellas como parte de una secuencia más larga.

[0037] En esta descripción, moléculas de polipéptidos en las categorías (1), (2) y (3) se dicen "corresponder" a las secuencias de aminoácidos de las proteínas recombinantes de la invención. También se refiere a tales polipéptidos como "variantes". La categoría de variantes dentro de la presente invención incluye, por ejemplo, fragmentos y muteínas de las proteínas desde la A hasta la L, así como moléculas mayores que consisten

esencialmente en por lo menos una de las secuencias de las proteínas desde la A hasta la L, sola o en combinación con otras de las proteínas desde la A hasta la L.

[0038] En este sentido, una molécula que "consiste esencialmente en" las proteínas desde la A hasta la L, sola o en combinación con cualesquier de las proteínas desde la A hasta la L, es una que es inmunoreactiva con muestras de personas infectadas con el *T. cruzi*, pero que no reacciona con muestras de pacientes con leishmaniasis, equistosomiasis, y otras enfermedades parasitarias e infecciosas, con muestras de pacientes con desórdenes autoinmunes y otras enfermedades, y con especímenes de personas normales.

[0039] Una proteína es un polipéptido que es homólogo con la proteína a que corresponde, y que retiene el atributo básico funcional – la capacidad de reaccionar selectivamente con muestras de personas infectadas con el *T. cruzi* – de la región correspondiente. Para fines de esta descripción, "homología" entre dos secuencias significa una semejanza que no llega a la identidad, indicativa de una derivación de la primera proveniente de la segunda. En particular, un polipéptido es "homólogo" a la proteína correspondiente si una comparación de las secuencias de los aminoácidos entre el polipéptido y la región correspondiente revela una identidad mayor al 40%, preferiblemente mayor al 50% y más preferiblemente al 70%. Tales comparaciones de secuencias pueden llevarse a cabo por algoritmos conocidos, tales como aquellos descritos en Pearson WR, Lipman DJ. "Herramientas mejoradas para la comparación de secuencias biológicas." *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(8):2444-2448, aquí dentro

90
incorporado por referencia en su totalidad, que son fácilmente implementados por la computadora.

[0040] Un fragmento de una proteína de la invención es una molécula en que uno o más aminoácidos son truncados de esa proteína. Mueñas y fragmentos pueden producirse, de acuerdo a la presente invención, por técnicas conocidas de síntesis de novo.

[0041] También ejemplar de variantes dentro de la presente invención son moléculas que son más largas que la proteína de la invención, pero que contienen una región o una mueña de ella dentro de la secuencia más larga. Por ejemplo, un variante puede incluir adicionalmente un compañero de fusión además de la proteína de la invención. Tal compañero de fusión puede permitir purificación más fácil de polipéptidos producidos por métodos recombinantes. Por ejemplo, el uso de la transferasa-S-glutationina (26 kilodaltons, GST) como compañero de fusión permite la purificación de polipéptidos recombinantes en perlas de agarosa-glutationa.

[0042] La porción de la secuencia de tal molécula que no sea aquel porción de la secuencia que corresponde a la región, puede ser o puede no ser homóloga a la secuencia de la proteína de la invención.

[0043] Será apreciado que polipéptidos más cortos que la proteína correspondiente de la invención pero que retienen la capacidad de reaccionar selectivamente con muestras de personas infectadas con el *T. cruzi* son convenientes para utilizarse en la presente

invención. De este modo, variantes pueden ser de la misma longitud, más largas o más cortas que la proteína de la invención, y también incluir secuencias en que hay sustituciones de aminoácidos de la secuencia parental. Estas variantes tienen que retener la capacidad de reaccionar selectivamente con muestras de personas infectadas con el *T. cruzi*.

[0044] En una incorporación, el ensayo de la invención utiliza FP4 como antígeno blanco. La Tabla II compara los resultados obtenidos por ensayar 45 especímenes argentinos preseleccionados en un ELISA FP4 con aquellos obtenidos por ensayarlos en el RIPA.

		RIPA	
		+	-
FP4 ELISA	+	9	0
	-	0	36

TABLA II

[0045] Los datos en la Tabla II muestran que en este grupo de especímenes, tanto la sensibilidad cuanto la especificidad del ELISA FP4 ambos fueron 100%.

[0046] Similarmente, la ejecución de un ELISA FP4+FP6 en comparación con el RIPA fue evaluado por ensayar 89 especímenes guatemaltecos preseleccionados.

		RIPA	
		+	-
FP4+ FP6 ELISA	+	10	1
	-	0	78

TABLA III

[0047] Los datos presentados en la Tabla III indican que en este grupo de muestras, la sensibilidad del ELISA FP4+FP6 fue 100% y que la especificidad fue 98,7%.

[0048] Como mostrado en la Fig. 2, en un ELISA FP4+FP6, llevado a cabo utilizando procedimientos estándares, un grupo de muestras RIPA-positivas previamente caracterizadas de varios países endémicos por Chagas produjeron una reactividad media (absorbancia) de 2,99. Por eso FP4+FP6 es la incorporación preferida entre las proteínas recombinantes ensayadas solas y en combinación en ese experimento.

[0049] Debe de ser aparente que incorporaciones diferentes de las que fueron específicamente descritas arriba pueden caer dentro del espíritu y del alcance de la presente invención, tales como proteínas recombinantes constituidas por combinaciones diferentes y/o colocaciones espaciales de las proteínas desde la A hasta la L. Por lo tanto, la presente invención no se limita por la descripción presentada arriba.

REIVINDICACIONES

1. Un plásmido vehículo recombinante constituyendo una secuencia de ADN que codifica un polipéptido recombinante que corresponde a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en FP3 [SEQ ID NO. 22], FP4 [SEQ ID NO. 8], FP5 [SEQ ID NO. 10], FP6 [SEQ ID NO. 14], FP7 [SEQ ID NO. 12], FP8 [SEQ ID NO. 16], FP9 [SEQ ID NO. 18] y FP10 [SEQ ID NO. 20].

2. El plásmido vehículo de la reivindicación 1, en lo cual el plásmido se selecciona de un grupo que consiste en plásmidos vehículos pGEX y pET.

3. El plásmido vehículo de la reivindicación 2, en lo cual el plásmido vehículo es pET-32a.

4. El plásmido vehículo de la reivindicación 1, en lo cual la secuencia de ADN comprende una seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 17, y SEQ ID NO. 19.

4. Un organismo transfectado con el plásmido vehículo de la reivindicación 1.

5. El organismo de la reivindicación 4, en lo cual el organismo es *Escherichia coli*.

6. Un polipéptido recombinante que constituye una secuencia que corresponde a una de FP3, FP4, FP6, FP7, FP8 and FP10.

7. Un kit que consiste en:
un primer polipéptido recombinante en lo cual el primer polipéptido recombinante es el primer polipéptido recombinante de la reivindicación 6, y

un segundo polipéptido recombinante.

94

8. El kit de la reivindicación 7, en lo cual el segundo polipéptido comprende una secuencia que corresponde a una seleccionada del grupo que consiste en Ag15 [SEQ ID NO. 2], FP3, FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9 y FP10, en lo cual el primer polipéptido recombinante es diferente del segundo polipéptido recombinante.

9. El kit de la reivindicación 7, en lo cual el primer polipéptido recombinante es FP4 y el segundo es FP6.

10. El kit de la reivindicación 7, adicionalmente conteniendo un tercer polipéptido recombinante seleccionado del grupo que consiste en Ag15, FP3, FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9 y FP10, en lo cual el primer polipéptido recombinante, el segundo polipéptido recombinante y el tercer polipéptido recombinante son diferentes.

11. El kit de la reivindicación 10, en lo cual el primer polipéptido recombinante corresponde a FP4, el segundo polipéptido recombinante corresponde a FP6 y el tercer polipéptido recombinante corresponde a FP10.

12. Un método de detección de la presencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en una muestra de un sujeto, comprendiendo:

95

(A) contactando la muestra con un polipéptido conteniendo una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en FP3, FP4, FP6, FP7, FP8 y FP10 o un fragmento inmunoreactivo de ellas, y

(B) detección de una interacción específica de acoplamiento con un anticuerpo en dicha muestra, en la cual la interacción del acoplamiento consiste en un acoplamiento específico entre anticuerpo en la muestra y un epítipo contenido dentro de la secuencia de aminoácidos presentada en FP3, FP4, FP6, FP7, FP8 y FP10 y en la cual dicha interacción específica de acoplamiento indica infección con el *Trypanosoma cruzi* en el pasado o el presente.

13. El método de la reivindicación 12, en lo cual el polipéptido del paso A se inmoviliza en una molécula portadora o en una fase sólida.

14. El método de la reivindicación 12, en lo cual el polipéptido del paso A tiene una secuencia obtenida de una cepa o de un clon del *Trypanosoma cruzi*.

15. El método de la reivindicación 12, en lo cual el polipéptido tiene uno o más aminoácidos truncados.

16. El método de la reivindicación 12, en lo cual el paso de detectar anticuerpos acoplados al polipéptido inmovilizado se lleva a cabo por agregar por lo menos un compuesto que detecta los anticuerpos.

17. El método de la reivindicación 16, en lo cual por lo menos un compuesto que facilita la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* es seleccionada de un grupo que consiste en un agente colorimétrico, un agente fluorescente, un agente quimioluminescente y un radionucleótido.

ABSTRACTO

Polipéptidos recombinantes se revelan que son útiles para diagnosticar la tripanosomiasis americana, o la enfermedad de Chagas, un padecimiento causado por el agente infeccioso *Trypanosoma cruzi*. Preferiblemente, las secuencias de ADN que codifican las proteínas recombinantes se insertan en plásmidos vehículos para expresarse en un organismo.

**POLIPÉPTIDOS RECOMBINANTES PARA DIAGNOSTICAR LA INFECCIÓN
CON EL TRYPANOSOMA CRUZI**

97

Esta solicitud reclama prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/430.654, presentada el 4 de Diciembre del 2002, aquí dentro incorporado por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] 1. Área de la invención.

[0002] La presente invención se refiere a polipéptidos recombinantes útiles para diagnosticar la tripanosomiasis americana, o enfermedad de Chagas. La enfermedad de Chagas es causada por el agente infeccioso llamado *Trypanosoma cruzi*. De forma más particular, la invención se refiere a: combinaciones específicas de polipéptidos recombinantes del *T. cruzi*, sintetizados utilizando técnicas de ingeniería genética; construcciones y procesos para la producción de los polipéptidos recombinantes; y un ensayo y un kit para detectar la infección con el *T. cruzi* que utilizan los polipéptidos recombinantes.

[0003] 2. Antecedentes

Expediente No		05065336	No de Folio
Item		No de unidades	√
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA	1	
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones: Arte final

Are Final

99

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 0565336 00000000 Folios: 99
Fecha (ARD): 2005-07-01 17:02:16
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NNCI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 46,079
FECHA : JUNIO 21 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	40117916	21/06/2005	62,639,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,0 .00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Blo 14812-841-001-3

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 05065336 00000000 Folios: 99
Fecha (AMD): 2005-07-01 17:02:16
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓	()	(✓)
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:

101

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

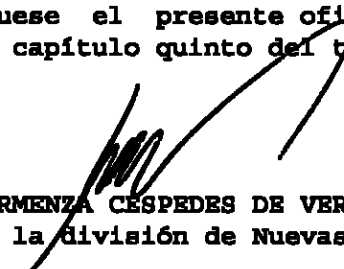
REFERENCIA	Radicación No.	05 65336
	Solicitud internacional	US2003/038458
	Fecha inicio fase nacional	04/07/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	- .. 8713

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

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene los poderes debidamente otorgados, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil.

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

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


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 23 SET. 2005
adpal