



(12)

**SOLICITUD de PATENTE**

- (43) Fecha de publicación: **17/09/2007**  
(22) Fecha de presentación: **14/09/2006**  
(21) Número de solicitud: **PA06010464**

- (71) Solicitante:  
**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO  
NACIONAL**  
Av. Instituto Politecnico Nacional No.  
2508 07300 Distrito Federal MX
- (72) Inventor(es):  
**ROSSANA ARROYO VERASTEGUI**  
Av. Instituto Politecnico Nacional, Numero  
2508 Distrito Federal 07360 MX  
**JAIME ORTEGA LOPEZ**
- (74) Representante:  
**LUIS ANTONIO CARRENO SANCHEZ.\***  
Av. Instituto Politecnico Nacional No. 2508,  
Edificio Administrativo, 1º Piso, Subdireccion de  
Vinculacion Tecnologica Distrito Federal 07360 MX

- (54) Título: **PROTEINA CITOTOXICA DE TRICHOMONAS VAGINALIS.**  
(54) Title: **CYTOTOXIC PROTEIN FROM THRICHOMONAS VAGINALIS.**

(57) **Resumen**

En la presente se divulgan una proteina citotoxica de Trichomonas vaginalis, el ADN codificante de la misma, un vector de expresion que comprende al ADN codificante de la proteina citotoxica, metodos de produccion de dicha proteina, composiciones farmaceuticas y de vacuna utiles para la prevencion y tratamiento de la infeccion provocada por Trichomonas vaginalis, asi como metodos y equipo para diagnosticar en un sujeto humano la infeccion por el protozoario parasito Trichomonas vaginalis.

(57) **Abstract**

The present invention discloses a cytotoxic protein from Trichomonas vaginalis, the encoding DNA thereof, an expression vector comprising the encoding DNA of the cytotoxic protein, methods for manufacturing said protein, pharmaceutical and vaccine compositions useful for preventing and treating the infection provoked by Trichomonas vaginalis, as well as methods and equipment for the diagnosis of a person suffering from an infection caused by the Trichomonas vaginalis parasite protozoa.

## PROTEÍNA CITOTÓXICA DE *TRICHOMONAS VAGINALIS*

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 La presente invención se relaciona a una proteína recombinante citotóxica de *Trichomonas vaginalis*, un ADN que la codifica, composiciones farmacéuticas y de vacuna que la contienen y un equipo de diagnóstico útil para detectar la infección por *Trichomonas vaginalis*.

### 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La tricomonosis es una enfermedad de transmisión sexual causada por el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*. Es la enfermedad de transmisión sexual no-viral más común, con un estimado de 250 millones de casos anuales en todo el mundo  
15 (Gerbase AC et al. 1998. Sex. Transm. Dis. 74, S12-S16; WHO, 2000). Sin embargo, esta estimación podría ser baja tomando en cuenta que la proporción de infecciones inaparentes es tan alta como 50% en mujeres y aún más alta en hombres (Fouts AC, and Graus SJ. 1980. J. Infect. Dis. 141, 137-143).

20 Esta enfermedad tiene importantes implicaciones médicas, sociales, y económicas. Las mujeres que están infectadas durante el embarazo están predispuestas a una ruptura prematura de las membranas placentarias, labor prematura, infantes de bajo peso corporal (Minkodd H et al. 1984. Am. J. Obstet. Gynecol. 150, 965-972; Cotch MF et al., 1997. Sex. Transm. Dis. 24, 353-360) y neumonía en el recién nacido (Szrka K et al.  
25 2002. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 49, 15-19). Esta enfermedad también se encuentra ligada al cáncer cervical (Gram I et al. 1992. Cancer Causes Control. 3, 231-236; Viiki M et al., 2000; Acta Oncol. 39, 71-75) e infertilidad (Grodstein F et al. 1993. Am. J. Epidemiol. 137, 577-584).

30 Como con otras enfermedades de transmisión sexual, la infección con *Trichomonas vaginalis* puede aumentar la predisposición de individuos a la infección con el virus de

la inmunodeficiencia humana (Laga M et al. 1994. Lancet. 344, 246-248). Se piensa que la tricomonosis puede aumentar la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana al causar una acumulación local de células infectadas o susceptibles al virus tales como los linfocitos y macrófagos (Laga M et al. 1991. AIDS. 5, S55-S63); además de degradar al inhibidor de proteasas secretado por los leucocitos (SLPI) que contribuye a inhibir la transmisión del VIH (Draper DW et al. 1998. J. Infect. Dis. 178, 815-819) y de incrementar la cantidad de partículas virales en el semen de pacientes doblemente infectados con el virus del VIH y con tricomonas, lo cual aumenta el riesgo de infectar a la pareja sexual (Wasserheit, 1992)

10

La tricomonosis presenta una extensa variedad de patrones clínicos. El espectro de la tricomonosis clínica en las mujeres va desde el estado de portador asintomático hasta la vaginitis, con una tercera parte de los pacientes infectados asintomáticos que vienen a ser sintomáticos dentro de los 6 meses (Rein MF. 1990. Trichomonads parasitic in humans. Springer-Verlag. New York, NY; Petrin D et al. 1998. Clin. Microbiol. Rev. 11, 300-317). *Trichomonas vaginalis* infecta principalmente el epitelio escamoso en el tracto genital. Una vez establecida, la infección persiste por largos períodos en las mujeres, pero solamente por un corto tiempo en el hombre. La tricomonosis en las mujeres usualmente se presenta durante los años reproductivos. Es rara la infección antes de la menarca o después de la menopausia. De acuerdo con la severidad de la infección, la tricomonosis puede clasificarse como aguda, crónica, o asintomática.

15  
20

El patrón clínico en la infección aguda revela una vulvitis difusa debido a una abundante leucorrea. La descarga es típicamente espumosa, amarilla o verde, y mucopurulenta. En la vagina y en la mucosa cervical se pueden encontrar unos pequeños puntos hemorrágicos. Este aspecto se conoce como "apariencia de fresa" y se observa únicamente en el 2% de los pacientes (Fouts AC, and Graus SJ. 1980. J. Infect. Dis. 141, 137-143; Petrin D et al. 1998. Clin. Microbiol. Rev. 11, 300-317).

25

30 En la infección crónica, los síntomas predominantes son ligeros, con prurito y dispareunia, mientras que la secreción vaginal puede ser muy escasa y mezclada con

moco. Esta forma de la enfermedad es particularmente importante desde una perspectiva epidemiológica debido a que esos individuos son la principal fuente de transmisión del parásito.

- 5 Alrededor del 20-50% de las mujeres infectadas son asintomáticas y tienen un pH vaginal normal de 3.8 a 4.2 y una flora vaginal normal.

Aunque la infección con *Trichomonas vaginalis* es considerada principalmente como una enfermedad de las mujeres, esta infección también se presenta en los hombres. La  
10 tricomonosis en los hombres es la mayoría de las veces asintomática, por lo que se consideran como portadores asintomáticos de *Trichomonas vaginalis*. La tricomonosis urogenital en los hombres se puede categorizar en tres grupos: un estado de portador asintomático, identificado por la investigación de contactos sexuales con mujeres infectadas; tricomonosis aguda, caracterizada por una uretritis profusa purulenta; y  
15 enfermedad sintomática ligera, la cual es clínicamente indistinguible de otras causas de uretritis no-gonocócica. En los hombres sintomáticos, es común la descarga clara y purulenta, disuria, y ligero prurito o sensación de ardor inmediatamente después de un acto sexual (Krieger JN 1995. Sex. Transm. Dis. 22, 83-96).

20 Hasta recientemente, el metronidazol era el antibiótico utilizado por excelencia para tratar la tricomonosis; sin embargo, se ha estimado que aproximadamente entre un 2.5 a 5% de todos los casos de tricomonosis presentan algún nivel de resistencia al tratamiento con este antibiótico (Schmid G et al. 2001. J. Reprod. Med. 46, 545-549). El tinidazol, un 5-nitroimidazol que esta químicamente relacionado al metronidazol, ha  
25 sido utilizado también en el tratamiento de la tricomonosis. En este sentido, también diversos estudios han evaluado diversas dosis del tinidazol para el tratamiento de la tricomonosis resistente al metronidazol (Hamed and Studemeister. 1992. Sex. Transm. Dis. 19, 339-340; Saurina G et al. 1998. Clin. Infect. Dis. 26, 1238-1239; Sobel J et al. 2001. Clin. Infect. Dis. 33, 1341-1346):

Diversos estudios han demostrado las actividades tricomonocidas *in vitro* de compuestos no-imidazol. Esos compuestos incluyen agentes para el tratamiento de otras enfermedades infecciosas y derivados específicos para el tratamiento de la tricomonosis como la Hamycina.

5

La Hamycina es un polímero aromático relacionado a la Anfotericina B. Este compuesto induce la muerte celular del parásito y es útil para destruir cepas de *Trichomonas vaginalis* resistentes y sensibles al metronidazol. Desafortunadamente, se han reportado efectos colaterales tanto en pacientes como en animales (Lushbaugh  
10 WB et al. 1995. J. Antimicrob. Chemother. 36, 795-802).

La aplicación intravaginal de paramomicina ha sido utilizada exitosamente para tratar la tricomonosis recurrente. Sin embargo, diversos efectos colaterales, incluyendo dolor y ulceración mucoide, lo hace un candidato improbable para la terapia clínica (Poppe  
15 WA. 2001. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 96, 119-120).

El nitrito de sodio y el nitroprusiato de sodio, utilizados tradicionalmente para prevenir la contaminación de alimentos, presentan actividad tricomonocida y son muy activos contra cepas de *Trichomonas vaginalis* resistentes y sensibles al metronidazol (Ryu  
20 and Lloyd. 1995. FEMS Microbiol. Lett. 130, 183-188).

Otros medicamentos investigados respecto a su actividad tricomonocida incluyen el sulfimidazol (Malagoli m et al. 2002. Pharmacol. Res. 46, 469-472), nifuratel, sulfato de berberina (Kaneda Y et al. 1991. Ann. Trop. Med. Parasitol. 85, 417-425), tetraciclinas  
25 lipofílicas (Katiyar and Edlind. 1991. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 2198-2202), y disulfiram (Bouma MJ et al. 1998. J. Antimicrob. Chemother. 42, 817-820).

Dadas las implicaciones de salud de la tricomonosis y la relativa incapacidad de métodos de diagnóstico para detectar *Trichomonas vaginalis*, existe una clara  
30 necesidad de una composición farmacéutica o vacuna contra la tricomoniasis, así como una prueba sensible y específica que pueda ser utilizada en el diagnóstico de la

tricomonosis. Por otro lado, dado el incremento en el número de cepas de *Trichomonas vaginalis* resistentes al metronidazol y sus derivados se requiere de la identificación y utilización de nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento de tricomonosis resistentes como el caso de proteasas involucradas en la virulencia de este parásito como la que participa en la citotoxicidad de *Trichomonas vaginalis* a la célula blanco, aquí llamada proteasa citotóxica.

### SUMARIO DE LA INVENCION

10 En un aspecto, la presente invención incluye proporcionar una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*, la cual es útil para la prevención, tratamiento y diagnóstico de la tricomoniasis.

15 En un aspecto más general, la presente invención incluye proporcionar una molécula de ADN codificante de la proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*, útil para la prevención, tratamiento y diagnóstico de la tricomoniasis.

20 En otro aspecto, la presente invención incluye proporcionar un vector que contiene a una molécula de ADN codificante de la proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.

Aun en otro aspecto, la presente invención incluye proporcionar una célula hospedera que contiene a un vector que a su vez contiene una molécula de ADN codificante de la proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.

25 En otro aspecto, la presente invención incluye también un método para la síntesis de una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.

Aún en otro aspecto, la presente invención además incluye anticuerpos dirigidos contra una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.

30

Aún en otro aspecto, la presente invención incluye un método para la obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.

- 5 Aún en otro aspecto, la presente invención incluye un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.

- 10 Aún en otro aspecto, la presente invención incluye una composición farmacéutica que contiene a una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis* útil para la prevención de la tricomoniasis.

- 15 Aún en otro aspecto, la presente invención incluye una composición farmacéutica que contiene inhibidores específicos para la proteasa citotóxica de *Trichomonas vaginalis* útil para el tratamiento de la tricomonosis.

- Aún en otro aspecto, la presente invención también incluye una composición de vacuna que contiene a una proteína citotóxica útil para la prevención y tratamiento de la tricomoniasis.

20

- Aún en otro aspecto, la presente invención además incluye proporcionar un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano utilizando una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina, semen, ó raspado vaginal, la cual se contacta con un anticuerpo específico contra una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*, para formar un complejo anticuerpo-proteína citotóxica.

25

- Aún en otro aspecto, la presente invención incluye proporcionar un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano utilizando una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de suero, plasma, o saliva, la cual se contacta con una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*, para formar un complejo proteína citotóxica-anticuerpo.

30

Aún en otro aspecto, la presente invención incluye proporcionar un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano utilizando una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, la cual se contacta con polinucleótido que codifica para una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*, para formar un complejo polinucleótido-polinucleótido.

Aún en otro aspecto, la presente invención incluye proporcionar un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano utilizando una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, la cual se contacta con anticuerpo dirigido contra una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*, para formar un complejo célula-anticuerpo.

Aún en otro aspecto, la presente invención también incluye proporcionar un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano utilizando una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, la cual se contacta con polinucleótido que codifica para una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*, para formar un complejo célula-polinucleótido.

La invención incluye además un equipo para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano. El equipo incluye los medios necesarios para medir la interacción anticuerpo-proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.

Aún en otro aspecto, la invención incluye un equipo para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano. El equipo incluye los medios necesarios para medir la interacción polinucleótido-polinucleótido codificante de una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.

Aún en otro aspecto, la invención incluye un equipo para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano. El equipo incluye los medios necesarios para medir la interacción anticuerpo-célula conteniendo una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.



Aún en otro aspecto, la invención además incluye un equipo para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano. El equipo incluye los medios necesarios para medir la interacción polinucleótido-célula conteniendo una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.

5

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

Los métodos para introducir vectores en las células son conocidos en el estado de la técnica. Ver por ejemplo, "Molecular Cloning; A laboratory Manual" 3rd Edition  
10 (Sambrook and Russell, 2001) o "Current Protocols in Molecular Biology" Vol. 1, II y III (Ausubel et al. 1998) para métodos generales de clonación y manejo de ácidos nucleicos.

Un método preferido para aislar o purificar la proteína citotóxica de *Trichomonas*  
15 *vaginalis* se define como comprender:

- 20 i) Crecer una célula hospedera transformada con un vector recombinante que codifica para la proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis* en un medio de cultivo adecuado.
- ii) Inducir la expresión de dicha secuencia del vector recombinante bajo condiciones adecuadas para la producción de una proteína soluble.
- 25 iii) Lisar dichas células transformadas y recuperar la proteína citotóxica de tal forma que esta retiene su conformación nativa y es esencialmente pura.

Una vez que la célula hospedera ha sido transformada con el vector recombinante, las células transformadas crecen en cultivo en presencia del antibiótico deseado, si es necesario. Cuando las células alcanzan la densidad de biomasa óptima, alrededor de  
30 0.6-1.0 D. O. 600 en frascos pequeños de cultivo y en fermentadores, las células son inducidas para producir la proteína recombinante. Las células son entonces colectadas

y lisadas para liberar la proteína recombinante. Preferiblemente, la lisis debe ocurrir cuando tenemos una proporción pasta:amortiguador de alrededor de 1 gramo de pasta por alrededor de 5-10 ml de amortiguador (peso/volumen) para reducir la viscosidad y volumen de muestra a cargar en la columna de Ni-NTA. Típicamente, la lisis se efectúa en presencia de N-lauril sarcosinato, u otro detergente suave, el cual solubiliza y estabiliza la proteína lo que permite que ésta se una a la columna de afinidad conteniendo níquel. La lisis se efectúa entre 4° y 24°C preferiblemente a una temperatura de alrededor de 4° a 15°C para retener el plegamiento nativo de la proteína citotóxica y reducir la proteólisis.

10

Los anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína citotóxica se pueden producir por cualquier hibridoma factible de obtenerse de acuerdo a los métodos clásicos a partir de la fusión por un lado de células de nódulos linfáticos y bazo de un animal, particularmente ratón y rata, inmunizados con polipéptidos o péptidos de la proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*, y por otro de células de una línea celular de mieloma, y ser seleccionados por la habilidad del hibridoma para producir los anticuerpos monoclonales que reconocen al polipéptido el cual fue utilizado inicialmente para la inmunización de los animales. Los anticuerpos monoclonales de acuerdo a la presente invención pueden ser versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales de ratón hechos por medio de la tecnología de ADN recombinante a partir de porciones de secuencias de ADN de ratón y/o humanas que codifican para cadenas H y L de clonas genómicas o de ADNc codificantes para cadenas H y L.

20

Las composiciones inmunogénicas se pueden preparar de acuerdo a métodos conocidos en el estado de la técnica. Las presentes composiciones comprenden una cantidad inmunogénica de la proteína recombinante citotóxica de *Trichomonas vaginalis* o péptidos de élla, usualmente combinados con un acarreador aceptable farmacéuticamente, preferiblemente incluyendo además un adyuvante.

25

Los acarreadores farmacéuticamente aceptables incluyen cualquier acarreador que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos al individuo que recibe la

30

composición. Los acarreadores adecuados son típicamente macromoléculas grandes, de lento metabolismo, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas. Tales acarreadores son ampliamente conocidos para aquellos expertos en la  
5 técnica.

Los adyuvantes preferidos para aumentar la eficacia de la composición incluyen, pero no se limitan a montanida, hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina, N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina, y RIBI. Además, los  
10 adyuvantes completo e incompleto de Freund se pueden utilizar para aplicaciones no humanas y propósitos de investigación.

Las composiciones inmunogénicas típicamente contienen vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como agua, sal, glicerol, etanol, etc. Adicionalmente, sustancias  
15 auxiliares, tales como agentes emulsificantes o humectantes, sustancias amortiguadoras de pH, preservativos, y similares, pueden ser incluidos en tales vehículos.

Típicamente, las composiciones inmunogénicas son preparadas como inyectables, ya  
20 sea soluciones líquidas o suspensiones; formas sólidas adecuadas para ser preparadas en solución o suspensión en vehículos líquidos antes de inyectarse. La proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis* también se puede incorporar en complejos estimuladores del sistema inmune junto con saponinas, por ejemplo QuilA (ISCOMS).

25 La proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis* puede ser administrable como parte de una composición farmacéutica. Tal composición farmacéutica puede incluir la proteína citotóxica en combinación con cualquier acarreador farmacéuticamente aceptable los cuales son conocidos en el estado de la técnica. Las composiciones deberán ser estériles y contener una cantidad efectiva terapéuticamente de la proteína citotóxica u  
30 otros compuestos terapéuticos en una unidad de peso o volumen disponibles para administración a un paciente. El término "farmacéuticamente aceptable" significa

material no-tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos. Las características del acarreador dependerán de la ruta de administración. Los acarreadores farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, emulsificadores, sales, amortiguadores, estabilizadores, solubilizadores, vehiculos y otros materiales los cuales son conocidos en el estado de la técnica.

Cuando son utilizados terapéuticamente, los compuestos son administrables en cantidades terapéuticamente efectivas. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva significa que la cantidad necesaria para retardar la consecuencia de, inhibir la progresión de, o detener la condición particular a ser tratada. Las cantidades terapéuticamente efectivas serán aquellas las cuales deseablemente tienen un efecto sobre la inflamación, o influyen la movilidad de los leucocitos después de un evento inflamatorio. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva variara de acuerdo a la edad del sujeto, y condición, así como la naturaleza y extensión de la enfermedad en el sujeto, todo lo cual puede ser determinado por un técnico en la materia. Las dosis pueden ser ajustadas por un médico, particularmente en el evento de cualquier complicación. Una cantidad terapéuticamente efectiva varia típicamente desde 0.01 mg/kg a alrededor de 1 g/kg, preferiblemente de alrededor de 0.1 mg/kg a alrededor de 200 mg/kg y más preferiblemente de alrededor de 0.2 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg, en una o más dosis de administración diaria, para uno o más días. El efecto de la composición administrada terapéuticamente puede ser monitoreado por procedimientos de diagnóstico estándar.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones y emulsiones. Ejemplos de solventes no-acuosos son el propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como el aceite de oliva, y esterres orgánicos inyectables tales como el etil oleato. Los acarreadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo medio salino o amortiguado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, xilitol, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactado o aceite fijados. Los vehículos intravenosos incluyen fluido y electrolitos (tales como aquellos

basados en la dextrosa de Ringer o xilitol), y similares. Preservativos y otros aditivos también pueden estar presentes tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y los similares.

- 5 Las composiciones de la invención pueden ser administrables por cualquier ruta convencional, incluyendo inyección, infusión gradual con respecto al tiempo, o administración oral en dosis sólida o formas encapsuladas. La administración puede ser, por ejemplo, oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, intrarespiratoria, lavados oral, vaginal, subcutánea, o transdermal. La ruta de  
10 administración dependerá sobre la composición de una preparación terapéutica particular de la invención, y en algunos casos, sobre el sitio intentado de la acción. Las composiciones pueden ser liberables directamente al sitio de acción.

- Otros sistemas de liberación pueden incluir sistemas de liberación al tiempo, liberación  
15 retardada, o liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar la administración repetitiva de los componentes activos de la invención, aumentando la conveniencia al sujeto y al médico. Muchos tipos de sistemas de liberación retardada están disponibles y son conocidos para aquellos técnicos en la materia. Ellos incluyen sistemas basados en polímeros tales como el ácido poliláctico y el ácido poliglicólico, polianhidridos y  
20 policaprolactonas; los sistemas no-polímeros incluyen lípidos tales como esteroides, y particularmente colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di y triglicéridos; sistemas de liberación a base de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; ceras, tabletas comprimidas utilizando ligadores y excipientes convencionales, implantes parcialmente fusionados y similares.  
25 Además, también pueden utilizarse sistemas de liberación basados en bombeo.

- La presente invención también proporciona equipos los cuales son útiles para el diagnóstico de la infección en humanos con *Trichomonas vaginalis*, lo cual permite la detección con alta sensibilidad mediante la formación de un complejo inmunológico  
30 entre la proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis* de SEQ ID NO: 1 o un fragmento reactivo de la misma y un anticuerpo que sea inmunoespecífico contra dicha proteína.

Una ventaja importante de esta prueba, es que se ha encontrado que dicha proteína citotóxica de SEQ ID NO: 1 esta presente en cantidades detectables en los raspados vaginales, en virtualmente todas las mujeres infectadas por tricomonas que se han puesto a prueba.

5

En la práctica del método, se obtiene primero una muestra de fluido corporal del sujeto humano. En donde, como en la modalidad preferida una muestra de fluido corporal es una secreción, o raspado vaginal de cérvix o tracto vaginal, o conducto cervical, o frotis de Papanicolao en mujeres, o una muestra de orina en mujeres y hombres: otro fluido corporal adecuado incluye suero, sangre y saliva. En forma alternativa, la muestra puede consistir de células del paciente, por ejemplo de cualquier sitio de infección.

10

Las pruebas de la invención pueden ser directas o competitivas. En una prueba de unión competitiva, el analito objetivo (proteína citotóxica de SEQ ID NO: 1) compite con un análogo del analito marcado por sitios de unión específicos sobre un agente de unión preferiblemente inmovilizado, por ejemplo anticuerpos que unen específicamente la proteína citotóxica de SEQ ID NO: 1, unido a una superficie sólida adecuada, por ejemplo, superficies de nitrocelulosa, nylon, PVC o poliestireno. La concentración del analito marcado unido al reactivo de captura, es inversamente proporcional a la cantidad de analito libre presente en la muestra, la cual puede detectarse cualitativamente en forma unida o en solución o puede cuantificarse, por ejemplo, mediante determinación espectrofotométrica de la proteína citotóxica de SEQ ID NO: 1 marcada en solución.

15

20

Las pruebas directas son típicamente pruebas tipo sándwich, en las cuales el analito objetivo se une a un agente de unión marcado, por ejemplo, anticuerpo marcado, y un anticuerpo de captura inmovilizado, formando un complejo en sándwich marcado inmovilizado que puede detectarse. El formato exacto de la prueba depende en general de la sensibilidad o el carácter específico esperado para la prueba. En algunas pruebas, particularmente para aquellas pruebas que usan reactivos lábiles, puede

30

añadirse un reactivo de control para confirmar la eficacia del reactivo marcado o el reactivo de captura.

5 En otro formato de prueba de unión directa, usado particularmente para análisis de frotis de Papanicolao, se trata una muestra de raspado cervical de un sujeto femenino para remover sustancias de interferencia, y se deposita sobre un sólido, en donde los componentes del raspado, que incluyen componentes de *Trichomonas vaginalis* como las cisteína proteinasas moduladas por hierro y a la proteína citotóxica, son inmovilizados, por ejemplo, por unión a la superficie tratada de un portaobjetos. Un  
10 agente de unión marcado, por ejemplo un anticuerpo anti-proteína citotóxica de SEQ ID NO: 1 marcado fluorescentemente, se aplica entonces al portaobjetos, se deja que se una a objetivos específicos, seguido de lavado, para remover el anticuerpo no unido. La presencia o ausencia del analito en la muestra, puede determinarse entonces mediante examen microscópico de fluorescencia en el portaobjeto.

15

Existe una amplia variedad de marcas que pueden usarse con una porción de unión (anticuerpo o antígeno) para formar un reactivo marcado. La elección de la marca depende de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con la porción de unión, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible y las provisiones de  
20 disposición. Las marcas de la presente invención pueden ser solubles o estar en partículas, pueden ser metálicas, orgánicas o inorgánicas, y pueden incluir marcas espectrales tales como proteína fluorescente verde, colorantes fluorescentes (por ejemplo fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, biotina, avidina y estreptavidina), compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, luciferina y luminol); y  
25 enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, etc.), marcas colorimétricas espectrales tales como oro coloidal, o partículas de carbono, o perlas coloreadas de vidrio o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

La marca puede acoplarse directa o indirectamente a un componente de la porción de  
30 unión de acuerdo a métodos bien conocidos en el estado de la técnica, tales como los que se describen en las patentes US 4,863,875 y US 4,373,932. Las marcas no

radioactivas se unen con frecuencia mediante medios indirectos. En general, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) es unida covalentemente a la porción de unión. El ligando se une entonces a una molécula de anti-ligando (por ejemplo, estreptavidina), la cual es inherentemente detectable, o se une covalentemente a un sistema de señales tales como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. La marca puede unirse a la porción de unión mediante un enlazador químico. Los dominios del enlazador son típicamente secuencias polipeptídicas, tales como secuencias de poli-glicina que tienen entre aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Los enlazadores preferidos son con frecuencia subsecuencias de aminoácidos flexibles. Dichos enlazadores flexibles son ampliamente conocidos, por ejemplo, esta disponible comercialmente el polietilenglicol. La porción de detección puede conjugarse también directamente con el compuesto generador de señales, por ejemplo, mediante conjunción con una enzima o fluoróforo.

De preferencia, las marcas dan una señal visible que es inmediatamente discernible después de inspección visual, o mediante detección de fluorescencia. Las marcas preferidas incluyen las que pueden observarse como: 1) quimioluminiscencia (usando peroxidasa de rábano y/o fosfatasa alcalina con substratos que producen fotones como productos de degradación); 2) cambio de color (oro coloidal, que produce un precipitado coloreado con el evento inmunoreactivo), y 3) fluorescencia (usando, por ejemplo, fluoresceína, y otras marcas fluorescentes).

Los anticuerpos pueden ser de tipo monoclonal o policlonal. Los anticuerpos de cadena sencilla o fragmentos de anticuerpos, son también útiles como porciones de unión. De esta manera, el término anticuerpo, como se usa en la presente, incluye también anticuerpo de cadena sencilla y fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos enteros, o los sintetizados *de novo* utilizando tecnologías de ADN recombinante.

La porción de unión de los reactivos marcados y de captura, son proteína citotóxica de SEQ ID NO: 1 y fragmentos inmunológicamente reactivos de las mismas. Para uso en



la prueba de la invención, la proteína citotóxica de SEQ ID NO: 1 puede sintetizarse químicamente o puede reproducirse en forma recombinante, o bien puede ser una molécula entera, o fragmentos de la misma.

- 5 La invención también contempla métodos para amplificar una secuencia blanco contenida en ácidos nucleicos derivados de *Trichomonas vaginalis* en la muestra, en donde el método comprende los pasos de: a) contactar la muestra de fluido corporal con al menos un oligonucleótido de amplificación para una proteína citotóxica y b) exponer la muestra a condiciones suficientes para amplificar la secuencia blanco. En
- 10 este sentido, el método para amplificar una secuencia blanco de ácido nucleico presente en los ácidos nucleicos derivados de *Trichomonas vaginalis* incluirán los pasos de: a) contactar la muestra con una sonda de detección la cual hibrida preferencialmente a la secuencia blanco o su complemento bajo condiciones severas de hibridación, formando de esta manera un híbrido estable para detección
- 15 sonda:blanco; y b) determinar si el híbrido está presente en la muestra como una indicación de la presencia o ausencia de *Trichomonas vaginalis*.

## EJEMPLOS

- 20 Los siguientes ejemplos tienen son proporcionados únicamente para propósitos ilustrativos y no son pensados para limitar el alcance de la invención.

**Ejemplo 1.** Amplificación de un fragmento de la proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.

25

Un fragmento de gen se amplificó por PCR utilizando ADN genómico del parásito *Trichomonas vaginalis* como molde con un iniciador en sentido 5'TCCCCACAGGATTGGCGTAAGAAGGGCGC-3' y el 5'-

30 CCCTCGAGCCAISWRTTYTTIACDATCCARTA-3' como iniciador antisentido, basado este último en la secuencia consenso que flanquea el Asn-173 catalítico de la cisteína proteinasa tipo papaína de tricomonas. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el

vector pCR4-TOPO y las clonas seleccionadas se secuenciaron por el método de terminación de cadena dideoxy (Sanger, et al. 1977) en un Secuenciador Automático AB1377. Las secuencias de ADN se analizaron utilizando los sistemas BLAST, EXPASY y WORKBENCH.

5

**Ejemplo 2.** Expresión y purificación de un fragmento de gen de 618 pb de la proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.

Un fragmento de gen de 618 pb se subclonó en el plásmido vector de expresión procariótica pET38b(+) (Novagen) conforme las instrucciones del fabricante. Las clonas positivas se indujeron con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosido (IPTG) a una concentración final de 1mM durante 4 h a 37°C para la producción de proteína recombinante. Enseguida, las bacterias se recolectaron; la pastilla se resuspendió en amortiguador de Laemmli y se hirvieron por 3 min; los sobrenadantes se separaron por centrifugación a 13,000 x g durante 3 min a 4°C y se analizaron por SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y ensayos de Western-blot. La proteína de fusión se purificó por cromatografía de afinidad utilizando resina Ni-NTA (Invitrogen) de conformidad con las recomendaciones del fabricante.

20 **Ejemplo 3.** Producción de anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*.

El fragmento de la proteína citotóxica recombinante purificado por afinidad de acuerdo al ejemplo 2, se homogeneizó con adyuvante completo de Freund a una proporción 1:1 y se utilizó para inmunizar ratones machos BALBC de 4 semanas de edad. Se efectuaron cuatro refuerzos con la proteína recombinante en adyuvante incompleto de Freund en intervalos de 7 días cada uno. Estos anticuerpos se utilizaron para ensayos de inmunofluorescencia e inhibición del daño citotóxico por el parásito a monocapas de células HeLa.

30

**Ejemplo 4. Ensayos de unión celular.**

Un extracto de aproximadamente  $2 \times 10^7$  parásitos se obtuvo en presencia de detergente y se clarificó por centrifugación a  $13,000 \times g$ , se incubó por 18 h a  $4^\circ\text{C}$  con  $1 \times 10^6$  células HeLa fijadas. Para los experimentos de competencia, se añadieron 1.5, 2.0, 4.0 o 10.0  $\mu\text{g}$  de proteína recombinante purificada al extracto de parásitos en detergente. Subsecuentemente, las proteinasas de las tricomonas unidas a la superficie de las células HeLa fijadas se eluyeron con amortiguador de Laemmli por 20 min a  $37^\circ\text{C}$ , y las proteinasas liberadas se analizaron por electroforesis en gel de substrato. Para los ensayos de competencia, las proteínas unidas a la superficie de las células HeLa también se eluyeron con amortiguador Laemmli por 3 minutos a  $100^\circ\text{C}$  y se analizaron por electroforesis desnaturizante en SDS-PAGE. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y la intensidad de las bandas de proteína y proteinasa se cuantificaron por densitometría con el programa "Quantity-one" (Bio-Rad). Duplicados de los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpo anti-histidina, acoplado a peroxidasa, a una dilución de 1:5000 para detectar a la proteína recombinante unida a las células HeLa mediante la técnica de quimioluminiscencia.

**Ejemplo 5. Ensayos de la inhibición de la citotoxicidad de *Trichomonas vaginalis*.**

Los parásitos se trataron con 50, 100, y 300  $\mu\text{g}$  de las fracciones IgG de los sueros anti-proteína citotóxica recombinante durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$ . Subsecuentemente, los parásitos tratados con anticuerpos se añadieron a monocapas en confluencia de células HeLa en una relación de 5:1 (parásito: célula huésped) y se incubaron por 1 h a  $37^\circ\text{C}$  bajo un atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . La destrucción de la monocapa se determinó mediante un método colorimétrico. La preincubación de las tricomonas con concentraciones en aumento del anticuerpo anti-proteína recombinante resultaron en una reducción dosis-dependiente de los niveles de citotoxicidad a las células HeLa. Después de la preincubación de los parásitos con 50, 100, y 300 mg/ml de la fracción

de IgG anti-proteína recombinante, la citotoxicidad se redujo por 45.8, 79.5, y 83.8 %, respectivamente.

**Ejemplo 6.** Detección de *Trichomonas vaginalis* utilizando tecnología PCR.

5

Para aislar ARN de raspado vaginales que posiblemente contienen *Trichomonas vaginalis*, se utilizó el Reactivo TRI (Sigma, Cat. No. T9424). El aislamiento del ARN se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 0.1 ml de raspado vaginal se mezcló con 0.1 ml de reactivo TRI a temperatura ambiente por 5  
10 min. La solución resultante se mezcló y reaccionó con 20 ml de BCP (1-bromo-3-cloropropano) a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugó a 4 °C y 12,000 × g, por 15 min. Después de la centrifugación se formaron 3 capas, en donde la capa superior que contenía el ARN se transfirió a un nuevo tubo y se le añadieron 50 µl de isopropanol y posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La  
15 solución resultante se centrifugó a 4°C y 12,000 × g durante 10 min y el sobrenadante se descartó. Los precipitados se lavaron con etanol al 75% y se resuspendieron en 20 µl de agua destilada. La síntesis de ADNc, se realizó con el Sistema ThermoScript RT\_PCR (Invitrogen, Cat. No. 11146-024). 5 µl del ARN purificado, 1 µl de hexámero, 2 µl de dNTP 10 mM, y 4 µl de agua tratada con DECP se mezclaron y se incubaron a de  
20 65°C durante 5 min y después se transfirieron a hielo. Después, al mismo tubo se agregaron 5 µl de amortiguador de síntesis de ADNc 5× y 1 µl de ThermoScript RT y se incubaron a 25°C durante 10 min, luego a 50°C durante 50 min y a 85°C por 5 min para detener la reacción. Posteriormente, se añadió 1 µl de RNasa H a la solución, y la mezcla resultante se incubó a 37°C por 20 min para remover el ARN restante. El ADNc  
25 sintetizado se utilizó como molde en una reacción de PCR. Para la reacción de PCR se agregaron 10 µl de amortiguador Thermopol, 2 µl de dNTP 10 mM, 2 µl de iniciador 5, 2 µl de iniciador 3, 2 µl de ADN molde, 81 µl de agua desionizada y 1 µl de ADN polimerasa para cada reacción. Después de mantener a 95°C por 2 min, se realizaron  
30 40 ciclos de reacción a 95°C por 40 s, 55°C por 30 s y 72°C por 2 min y un ciclo final de extensión de 72°C por 2 min. Los productos de amplificación de ADN se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

**Ejemplo 7. Detección de *Trichomonas vaginalis* utilizando tecnología ELISA.**

Para confirmar la infección con *Trichomonas vaginalis* se realizó el siguiente experimento: Una solución conteniendo a la proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis* de SEQ ID NO: 1 en una concentración de 1.0 µg/ml se diluyó en amortiguador de carbonato 0.1M (pH 9.5) y 100 µl de la solución diluida se añadieron a cada pozo de la placa de 96 pozos de fondo plano. La placa se selló y se incubó a temperatura ambiente durante 18 h para que se unieran los antígenos (proteína citotóxica) a la base de cada pozo. La solución remanente se descartó. Después los pozos se bloquearon con 300 µl de amortiguador de fosfatos (PBS) conteniendo BSA al 0.5% a temperatura ambiente por 6 h. La solución remanente se descartó y se añadieron 100 µl de diluyente de muestra conteniendo BSA 1%, en PBS Triton X-100 al 0.5% y posteriormente se añadieron 50 µl de muestra a cada pozo. La mezcla se incubó por 60 min a 37°C. Posteriormente, la placa se lavó 5 veces con 300 µl de PBS-Tween 20 al 0.05%. Enseguida, el conjugado de proteína citotóxica-enzima peroxidasa se diluyó en diluyente caseína/PBS conteniendo Tween 20 y se añadió 100 µl por pozo y se incubó a 37°C durante 30 min. Luego la placa se lavó 5 veces con PBS/Tween 20 al 0.05%. Para el desarrollo de color se agregaron 100 µl de la solución de sustrato conteniendo 100 µg/ml de TMB, peróxido de hidrógeno al 0.006% y amortiguador de fosfato-cítrico (pH 4.5) y se incubó en un cuarto oscuro durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción se paró al agregar 100 µl de solución de paro (ácido sulfúrico 1N) a cada pozo y se midió la densidad óptica a 450 nm utilizando un lector de placas de 96 pozos.

El desarrollador de color, TMB, en la solución de sustrato fue catalizado por el conjugado de proteína citotóxica-enzima peroxidasa unido a los anticuerpos, ocasionando el desarrollo del color, por lo que la presencia o ausencia de anticuerpos anti-proteína citotóxica se detectó al medir el grado de desarrollo de color en términos de densidad óptica.

Aquellas personas expertas en la técnica reconocerán, o serán capaces de acertar, utilizando no más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las incorporaciones especificadas de la invención, aquí descrita. Esta invención no intenta ser limitativa a cada una de las incorporaciones o a los ejemplos proporcionados aquí, los cuales son únicamente ilustrativos.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

Número de secuencias: 2

Información para SEQ ID NO: 1

- 5 (i) Características de secuencia:
- (A) Longitud: 918 pares de bases
  - (B) Tipo: ácido nucleico
  - (C) Tipo de cadena: simple
  - (D) Topología: lineal
- 10 (ii) Tipo de molécula: ADN
- (iii) Descripción de secuencia: SEQ ID NO:1

	ATG CTT ACA CAA CAG AAT GAA CGG AAA GCA TTT CTT GGA TGG ATG	45
	CGA GAG ACA GGA AAC ATC TTC ACA GGC GAT GAA TAT CAG TCA CGT	90
15	TTT GGA ATT TGG CTC TCA AAC AAG CGA TTC GTT GAA GAA CAC AAT	135
	CGT GCC AAC CTT GGA TTC ACC GTT GCA CTC AAT AGA CTA GCA CAT	180
	CTC ACA CCA GCA GAA TAC CAT TCA CTT CTT GGA TTC CGT AAT AAC	225
	GGC GCC AAC AAT AAA GCT GTA AAA TCT CAC TCA AAA GCG AAC GAT	270
	TGT ATT GAT TGG CGT TCA AAA GGT GTC GTA AAT CCA ATT CAA GAT	215
20	CAA GGT CAG TGC GGA TCT TGC TGG GCC TTC TCT GCA ATC CAA GCT	360
	CAA GAA TCT CAA TAC GCG ATT ACA TCT GGA GAA CTC CAA AAG CTT	405
	TCA GAG CAG AAC CTT GTT GAT TGC GTT ACT ACA TGT GAT GGC TGC	450
	GAA GGA GGT CTT ATG ACA AAC GCC TAT GAT TAC GTT ATT AAA TAT	495
	CAA GAC GGC AAG TTC ATG CTT GAA AAT GAT TAC CCA TAT ACA GCC	540
25	TAT TAC TAT GAC TGT CTA TTC GAC ACA GAT AAA GCT GTT TCT AAT	585
	ATT GTT TCA TAC ATA AAT GTT GTT GAA GGC GAT GAA AAT GAT CTT	630
	GCA ACA AAA ATA TCC ACA AAT GGC CCA GCT GCT GTA GCA ATC GAT	675
	GCT TCA CAT TAC TCA TTC CAA CTC TAC TCA CAA GGT ATC TAC AAT	720
	GTG CCA TCA CGC TCC TCT TAT GGC CTC GAT CAC GGC GTT GGA TGC	765
30	GTT GGA TAC GGC GCA GAA GGA TCA ACG AAG TAC TGG ATT GTT CGT	810
	AAC TCA TGG GGT CTT GGT TGG GGT GAA GAA GGG TAC ATC CGG ATG	855
	ATT AAG GAC AAA GGC AAC CAG TGT GGC ATT GCT TCA ATG GCT TGC	900

ATA CCA GTT GAT AAA TAA

918

## Información para SEQ ID NO: 2

## (i) Características de secuencia:

- 5 (A) Longitud: 618 pares de bases  
 (B) Tipo: ácido nucleico  
 (C) Tipo de cadena: simple  
 (D) Topología: lineal

## (ii) Tipo de molécula: ADN

- 10 (iii) Descripción de secuencia: SEQ ID NO: 2

	TCC CCA CAG GAT TGG CGT AAG AAG GGC GCC CTC AAT AAA GCT GTA	45
	AAA TCT CAC TCA AAA GCG AAC GAT TGT ATT GAT TGG CGT TCA AAA	90
	GGT GTC GTA AAT CCA ATT CAA GAT CAA GGT CAG TGC GGA TCT TGC	135
15	TGG GCC TTC TCT GCA ATC CAA GCT CAA GAA TCT CAA TAC GCG ATT	180
	ACA TCT GGA GAA CTC CAA AAG CTT TCA GAG CAG AAC CTT GTT GAT	225
	TGC GTT ACT ACA TGT GAT GGC TGC GAA GGA GGT CTT ATG ACA AAC	270
	GCC TAT GAT TAC GTT ATT AAA TAT CAA GAC GGC AAG TTC ATG CTT	315
	GAA AAT GAT TAC CCA TAT ACA GCC TAT TAC TAT GAC TGT CTA TTC	360
20	GAC ACA GAT AAA GCT GTT TCT AAT ATT GTT TCA TAC ATA AAT GTT	405
	GTT GAA GGC GAT GAA AAT GAT CTT GCA ACA AAA ATA TCC ACA AAT	450
	GGC CCA GCT GCT GTA GCA ATC GAT GCT TCA CAT TAC TCA TTC CAA	495
	CTC TAC TCA CAA GGT ATC TAC AAT GTG CCA TCA CGC TCC TCT TAT	540
	GGC CTC GAT CAC GGC GTT GGA TGC GTT GGA TAC GGC GCA GAA GGA	585
25	TCA ACG AAG TAT TGG ATC GTC AAA AAC AGC TGG	618

30



**REIVINDICACIONES**

1. Un polinucleótido aislado o purificado, caracterizado porque comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 98% de identidad con la SEQ ID NO: 1.  
5
2. Un polinucleótido aislado o purificado, caracterizado porque hibrida bajo condiciones altamente astringentes con el polinucleótido reclamado en la reivindicación 1.
- 10 3. Un polinucleótido aislado o purificado, caracterizado porque comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 98% de identidad con la SEQ ID NO: 2.
4. Un polinucleótido aislado o purificado, caracterizado porque hibrida bajo condiciones altamente astringentes con el polinucleótido reclamado en la  
15 reivindicación 3.
5. Un polipéptido aislado o purificado, caracterizado porque es codificado por los polinucleótidos reclamados en las reivindicaciones 3-4.
- 20 6. Un vector de expresión o clonación caracterizado porque comprende una secuencia de polinucleótido de conformidad con las reivindicaciones 3-4.
7. Un vector de expresión de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque dicho vector es seleccionado del grupo formado por plásmidos, cósmidos  
25 y fagos.
8. Una célula hospedera caracterizada porque comprende un vector de conformidad con las reivindicaciones 6-7.
- 30

9. Anticuerpos policlonales o monoclonales caracterizados porque reconocen específicamente al menos uno de los polinucleótidos, y/o polipéptidos definidos en las reivindicaciones 3-5.
- 5 10. Un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido de conformidad con la reivindicación 5.
11. El uso de al menos uno de los siguientes elementos: polinucleótidos de conformidad con las reivindicaciones 3-4, polipéptidos de conformidad con la  
10 reivindicación 5, para la preparación de una composición farmacéutica.
12. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende al menos uno de los siguientes elementos: polinucleótidos de conformidad con las reivindicaciones 3-4, polipéptidos de conformidad con la reivindicación 5 y un  
15 vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. El uso de al menos uno de los siguientes elementos: polinucleótidos de conformidad con las reivindicaciones 3-4, polipéptidos de conformidad con la reivindicación 5, para la preparación de una composición inmunogénica para la  
20 prevención y el tratamiento de la tricomoniasis.
14. Una composición inmunogénica caracterizada porque comprende al menos uno de los siguientes elementos: polinucleótidos de conformidad con las reivindicaciones 3-4, polipéptidos de conformidad con la reivindicación 5; y un  
25 vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada en que además contiene al menos un compuesto seleccionado del grupo formado por adyuvante de aluminio, QS21, SBAS2 o adyuvante  
30 incompleto de Freund.

16. Una vacuna anti-tricomonosis caracterizada porque comprende al menos uno de los siguientes elementos: polinucleótidos de conformidad con las reivindicaciones 3-4, polipéptidos de conformidad con la reivindicación 5; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

17. Un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano caracterizada por los siguientes pasos:

10

a. Contactar una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, con al menos un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 9;

b. Detectar la formación de un complejo inmunológico anticuerpo-proteína citotóxica mediante técnicas colorimétricas o espectrofotométricas.

15

18. Un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano caracterizada por los siguientes pasos:

20

a. Contactar una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de suero, plasma, o saliva, con al menos uno de los siguientes elementos: polinucleótidos de conformidad con las reivindicaciones 3-4, polipéptidos de conformidad con la reivindicación 5.

25

b. Detectar la formación de un complejo inmunológico anticuerpo-proteína citotóxica mediante técnicas colorimétricas o espectrofotométricas.

19. Un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano caracterizada por los siguientes pasos:

30

a. Contactar una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, con al menos un polinucleótido de conformidad con las reivindicaciones 3-4.

5 b. Detectar la formación de un complejo polinucleótido-polinucleótido mediante técnicas de biología molecular.

20. Un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano caracterizada por los siguientes pasos:

10

a. Contactar una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, con al menos un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 9.

15

b. Detectar la formación de un complejo célula-anticuerpo mediante técnicas colorimétricas o espectrofotométricas.

21. Un equipo para diagnóstico *in vitro* para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano, caracterizado porque comprende los siguientes elementos:

20

a. al menos un elemento seleccionado del grupo formado por: polinucleótidos de conformidad con las reivindicaciones 3-4, polipéptidos de conformidad con la reivindicación 5;

25

b. reactivos para constituir un medio adecuado para la reacción de unión entre una muestra de prueba y al menos uno de los elementos definidos en a);

30

- c. reactivos que permitan la detección de complejos antígeno-anticuerpo producidos por dicha reacción de unión, dichos reactivos posiblemente traen consigo una marca susceptible de ser detectada por un segundo reactivo marcado.

5

22. Un equipo para diagnóstico *in vitro* para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano, caracterizado porque comprende los siguientes elementos:

10

- a. anticuerpos de conformidad con la reivindicación 9;
- b. reactivos para constituir un medio adecuado que permita la unión entre una muestra problema y al menos uno de los anticuerpos;

15

- c. reactivos que permitan la detección de complejos antígeno-anticuerpo producidos por dicha reacción de unión, dichos reactivos posiblemente traen consigo una marca susceptible de ser detectada por un segundo reactivo marcado.

**RESUMEN**

En la presente se divulgan una proteína citotóxica de *Trichomonas vaginalis*, el ADN codificante de la misma, un vector de expresión que comprende al ADN codificante de la proteína citotóxica, métodos de producción de dicha proteína, composiciones farmacéuticas y de vacuna útiles para la prevención y tratamiento de la infección provocada por *Trichomonas vaginalis*, así como métodos y equipo para diagnosticar en un sujeto humano la infección por el protozooario parásito *Trichomonas vaginalis*.