

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 262**

21 Número de solicitud: 201031097

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

16.07.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.02.2012

Fecha de la concesión:

22.04.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.05.2013

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (85.0%)**

SERRANO 117

28006 MADRID (Madrid) ES y

FUNDACIÓN PARA LA FORMACIÓN E

**INVESTIGACIÓN SANITARIA DE LA REGIÓN DE
MURCIA, FFIS (15.0%)**

72 Inventor/es:

THOMAS CARAZO, Mari Carmen;

LÓPEZ LÓPEZ, Manuel Carlos;

MARAÑÓN LIZANA, Concepción;

FERNÁNDEZ VILLEGAS, Ana Isabel y

SEGOVIA HERNÁNDEZ, Manuel

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.**

57 Resumen:

Método de diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas.

La presente invención se refiere a un péptido y al método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas que permite diferenciar pacientes con Chagas crónico de individuos sanos y de aquellos con otras enfermedades infecciosas afines, basado en la detección anticuerpos frente a dicho péptido. Además, este método permite diferenciar pacientes con la enfermedad de Chagas en forma clínica indeterminada de aquellos pacientes de Chagas con patologías cardíaca y digestiva. También permite diferenciar pacientes con cardiopatía chagásica de aquellos con alteraciones cardíacas no chagásicas (miocarditis, cardiopatías idiopáticas, infarto de miocardio, etc.). La presente invención permite también evaluar la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad en enfermos de Chagas en fase crónica, especialmente con alteraciones cardíacas. La presente invención se refiere también a un kit para llevar a cabo dicho método de diagnóstico diferencial.

ES 2 373 262 B1

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas.

- 5 La presente invención se encuentra dentro de la medicina, la biología molecular, la inmunología y la parasitología, y se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas, permitiendo diferenciar pacientes en fase indeterminada de pacientes crónicos con patologías cardíaca y digestiva, así como para evaluar la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad en enfermos de Chagas en fase crónica cardíaca.

10 Estado de la técnica anterior

La enfermedad de Chagas (enfermedad de Chagas-Mazza, mal de Chagas o tripanosomiasis americana), es una enfermedad parasitaria tropical principalmente del Centro y Sudamérica, generalmente crónica y cuyo agente etiológico es el protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Se estima que da lugar a unas 21.000 muertes cada año (WHO, 2002, 2005), con aproximadamente 50.000-200.000 nuevos casos diagnosticados por año (Tarleton RL, 2007. *PLoS Med* 4(12): e332). Aunque tradicionalmente la enfermedad se ha visto confinada a la América Latina, actualmente se encuentra en expansión a zonas no endémicas como consecuencia de los procesos migratorios, por lo que ha sido necesaria la implantación de pruebas diagnósticas en bancos de sangre y centros de salud en aquellos países con una alta tasa de población inmigrante proveniente de zonas endémicas. Así, la incidencia de la enfermedad en dicha población inmigrante es del 16 por 1.000 en Australia, 9 por 1.000 en Canadá, 25 por 1.000 en España y 8-50 por 1.000 en EEUU (Schmunis GA *et al*, 2007. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102 Suppl 1:75-85).

T. cruzi es un protozoo parásito flagelado que pertenece al Orden Kinetoplastida y presenta una fase obligada de multiplicación intracelular en el hospedador vertebrado, en el cual es capaz de infectar los diferentes tipos de células. La forma infectiva del parásito o tripomastigote metacíclico se encuentra en el tracto gastrointestinal del hospedador invertebrado o insecto transmisor de la enfermedad y es transmitido al hospedador vertebrado tras la picadura del insecto, el cual, además, defeca en el momento de la picadura favoreciéndose la entrada del parásito por el rascado provocado por el carácter irritante de las heces. El tripomastigote metacíclico es visible en la sangre como un tripomastigote fusiforme, con forma de "C" o de "S", de 20 μm de largo por 1 μm de ancho y no tiene capacidad replicativa. Cuando el parásito infecta en el hospedador vertebrado las células de distintos tejidos, principalmente del músculo cardíaco estriado, del músculo esquelético y del músculo liso, se acorta el flagelo y se transforma en un amastigote redondo de 2 a 5 μm de diámetro. El amastigote se multiplica por medio de fisión binaria formando "racimos" o "nidos" que se acumulan en la célula huésped hasta que esta se rompe. Los parásitos liberados de la célula se transforman a la forma de tripomastigote sanguíneo y son liberados al torrente sanguíneo. Los mismos tienen un tamaño que varía entre 15 y 20 μm , tienen flagelo libre gracias al cual pueden moverse, un cinetoplasto voluminoso, terminal o subterminal, y un núcleo oval. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células para repetir el ciclo, pero no son capaces de multiplicarse en la sangre, ya que la única forma replicativa en el vertebrado es la forma amastigote intracelular.

Los hospedadores invertebrados son hematófagos y adquieren el parásito al alimentarse del hombre o de los animales domésticos o silvestres infectados. Los tripomastigotes migran al intestino medio del insecto, donde se transforman en epimastigotes, flagelados anchos, muy móviles, con el cinetoplasto entre el núcleo y el flagelo libre. Allí se dividen un gran número de veces, quedando el insecto infectado de por vida. Los epimastigotes migran al intestino posterior donde, debido a la acidez de la zona, se transforman a tripomastigotes metacíclicos siendo excretados con las heces en el momento de la picadura.

En el caso de la infección causada por *T. cruzi* en el hombre, la enfermedad presenta dos estados severos. La fase aguda, tiene lugar tras la picadura del insecto y, aunque suele pasar desapercibida, a ella se asocia aproximadamente el 10% de mortalidad. La fase crónica, que puede desarrollarse incluso pasados más de diez años, se caracteriza por la aparición de cardiomegalia, anormalidades electrocardiográficas, arritmias (Chagas crónico con afectación cardíaca), aperistalsis, megaesófago y megacolon (Chagas crónico con afectación digestiva), pudiendo llegar a causar la muerte. La fase aguda tiene una duración de dos a tres meses, aproximadamente, progresando para dar lugar a una fase crónica asintomática, actualmente llamada fase indeterminada, la cual se caracteriza por la persistencia de la infección sin presentar problemas clínicos aparentes. Cerca del 40% de los casos serológicamente positivos se encuentran en fase indeterminada, la cual evoluciona frecuentemente a una fase crónica sintomática varios años más tarde.

La enfermedad de Chagas es diagnosticada de forma rutinaria mediante diversos métodos serológicos comerciales como las técnicas de ELISA, inmunofluorescencia indirecta (IFI) o hemaglutinación, para las cuales se utilizan extractos completos o semipurificados de proteínas de las formas epimastigotes del parásito *T. cruzi*, mezclas de proteínas recombinantes o péptidos sintéticos correspondientes a antígenos o fragmentos antigénicos del parásito (Umezawa *et al.*, 1996. *J. Clin Microbiol.* 34:2143-2147; da Silveira *et al.*, 2001. *Trend Parasitol.* 17:286-291). Otro método de diagnóstico serológico desarrollado es el denominado ID-PaGIA-Chagas (Rabello *et al.*, 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (1): 77-82), basado en una reacción de aglutinación en gel usando tres péptidos sintéticos derivados de sendos antígenos de *T. cruzi*, o el llamado INNO-LIA (Saez-Alquezar *et al.*, 2000. *J. Clin Microbiol.* 38:851-854), basado en la reactividad frente a siete proteínas recombinantes fijadas sobre un soporte de nylon. El kit inmunocromatográfico Stat-Pack utiliza seis proteínas recombinantes y presenta altos niveles de sensibilidad y especificidad (Ponce *et al.*, 2005. *J Clin Microbiol* 43(10): 5065-5068). Estos métodos han sido especialmente propuestos para la obtención de resultados rápidos de seropositividad en *screenings* en bancos de sangre, emergencias médicas y en trasplantes de órganos. Sin embargo, sólo permiten obtener un resultado cualitativo (positivo/negativo) y, por tanto, son de baja uti-

alidad para evaluar la evolución del paciente chagásico. Recientemente, se ha evaluado la eficacia de nueve diferentes sistemas de diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas, siete de ellos comerciales (Caballero *et al.*, 2007. *Clinical and Vaccine Immunology*. 14(8):1045-1049), mostrando porcentajes de sensibilidad y especificidad que van desde el 75% al 100%, usando como referencia un ensayo de *Western blot* (inmunoblot) con antígenos secretores-excretorios de formas tripomastigotes de *T. cruzi*. Sin embargo, ninguno de los métodos descritos permite el diagnóstico diferencial entre las distintas formas clínicas de la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

En general, los sistemas de diagnóstico serológico permiten detectar anticuerpos en sueros de pacientes crónicos, pero resultan poco útiles para evaluar la evolución de los pacientes bajo tratamiento, ya que los niveles de anticuerpos persisten, de forma estable, durante mucho tiempo. Probablemente, el tratamiento si bien al disminuir la carga parasitaria pueda influir en la reducción del nivel de anticuerpos, al destruir el parásito puede conducir a la exposición al sistema inmune de nuevos componentes parasitarios, con la consiguiente posible generación de anticuerpos con otras especificidades. Estos dos efectos conjugados (aumento del título de algunos anticuerpos y disminución de otros) dan lugar a una aparente estabilidad del título medido frente a proteínas de lisados totales del parásito o combinaciones de antígenos. Por tanto, estos kits comerciales no permiten detectar la dinámica de respuesta después del tratamiento ni, por tanto, reconocer los casos en que la terapia no es efectiva.

Los dos únicos medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son Nifurtimox, desarrollado en 1960 por Bayer, y Benznidazol, desarrollado en 1974 por Roche. La ventaja terapéutica de estos fármacos en las fases crónicas de la enfermedad sigue siendo objeto de controversia y, además, ambos presentan altas tasas de efectos secundarios indeseables.

Consiguientemente, sigue siendo fundamental desarrollar herramientas que permitan el diagnóstico diferencial y así determinar por una parte, en qué fase de la enfermedad se encuentra el paciente y, por otra, hacer seguimiento del transcurso de la misma y valoración de la evolución de la enfermedad y eficacia del tratamiento.

Descripción de la invención

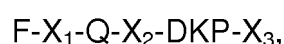
La presente invención proporciona un nuevo marcador y un nuevo método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, para el diagnóstico diferencial de los estadios crónico (con alteraciones cardíacas o digestivas) del estadio indeterminado, permitiendo el establecimiento de grupos de pacientes según el grado de la patología, así como para hacer seguimiento y evaluar la respuesta al tratamiento y evolución de dicha enfermedad en pacientes con cardiopatía chagásica. Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende dicho nuevo marcador y al uso de dicho kit para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, para el diagnóstico diferencial de las distintas formas clínicas de dicha enfermedad y para hacer seguimiento del paciente y/o evaluación del estado de su enfermedad tras la administración del tratamiento.

Este marcador permite diferenciar pacientes con la enfermedad de Chagas en cualquiera de las formas de la enfermedad crónica (indeterminado, cardíaca, digestiva) de aquellos pacientes con patologías infecciosas afines (leishmaniosis, malaria, tuberculosis). Este marcador diferencia pacientes con cardiopatía chagásica de aquellos pacientes con alteraciones cardíacas no chagásicas (miocarditis agudas, infarto agudo de miocardio, miocardiopatías idiopáticas, insuficiencia cardíacas, etc).

Así, la presente invención aporta una solución, bajo una técnica serológica no invasiva de fácil y rápida realización a la vez que económica, a la necesidad de identificar la fase en la que se encuentran los pacientes chagásicos, ya que permite diferenciar los pacientes en fase crónica de los pacientes en fase indeterminada. Más aún, la presente invención permite diferenciar si el paciente en fase crónica presenta afección cardíaca o digestiva de aquellos que no las presentan.

La presente invención resulta útil para el seguimiento de los pacientes chagásicos crónicos, principalmente con alteraciones cardíacas, tras la administración del tratamiento, dado que el nivel de anticuerpos específicos frente a este marcador disminuye, lo que puede considerarse como índice de eficacia del tratamiento y mejora de la enfermedad. La no modificación del nivel de anticuerpos frente al marcador de la presente invención podría implicar fallo terapéutico o bien el abandono o no correcto seguimiento del tratamiento por parte del paciente.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un péptido (en adelante llamado péptido de la invención) de secuencia aminoacídica:



donde X_1 representa un aminoácido que se selecciona de entre G y A; donde X_2 es un grupo de 4 aminoácidos que se seleccionan de entre A, E y G; donde X_3 es un grupo de 2 aminoácidos que se seleccionan de entre S, L, P y A.

Preferiblemente, X_2 es AAX_4 , donde X_4 es un grupo de dos aminoácidos que se seleccionan de entre A, E y G. Preferiblemente, X_4 es AA, AG o EG.

Preferiblemente, X₃ es SL, PP, AP o AA.

En una realización preferida del péptido de la invención, las secuencias aminoacídicas se seleccionan de entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. En una realización más preferida del péptido de la invención, la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1.

Un péptido es una molécula formada por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Los aminoácidos son moléculas orgánicas que presentan un grupo amino y un grupo carboxilo y que forman parte de las proteínas. Los aminoácidos que forman parte de las proteínas son 20, y pueden representarse por tres letras o por una sola letra. Así, F es fenilalanina, Q es Glutamina, D es ácido aspártico, K es lisina, P es prolina, G es glicina, A es alanina, E es ácido glutámico, S es serina y L es leucina.

En otra realización preferida del péptido de la invención, dicho péptido está caracterizado porque su secuencia aminoacídica comprende la secuencia aminoacídica del péptido de la invención según se ha descrito arriba. El marcador puede ser un péptido de la invención flanqueado por aminoácidos u otras moléculas no relevantes para su función como marcador, pero que pueden permitir el anclaje a un soporte sólido de forma que toda la secuencia antigénica relevante del péptido quede disponible para ser reconocida por un anticuerpo.

En otra realización preferida del péptido de la invención, dicho péptido está caracterizado porque su secuencia está repetida al menos dos veces. De esta forma, la secuencia del péptido de la invención puede estar repetida al menos dos veces, pudiendo estar cada repetición enlazada por aminoácidos o moléculas no relevantes para el reconocimiento específico del péptido por los anticuerpos.

Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de la invención como marcador para el diagnóstico diferencial, pronóstico o seguimiento del estadio de la enfermedad de Chagas en una muestra biológica aislada.

Los términos “diagnóstico” y “diagnóstico diferencial”, tal y como se utilizan en la presente invención, se refieren a la capacidad de discriminar entre individuos infectados por el parásito *T. cruzi* de aquellos no infectados por *T. cruzi* o infectados por otros agentes infecciosos relacionados (como los causantes de leishmaniosis, malaria, tuberculosis, etc). También se refiere, pero sin limitarnos, a la capacidad de discriminar entre muestras procedentes de pacientes que presentan diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas: la fase aguda, poco después de la infección, la fase indeterminada y la fase crónica. A su vez, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos adecuados. Esta discriminación, tal y como es entendida por un experto en la materia, no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente.

El término “pronóstico”, tal y como se emplea en la descripción de la invención, se refiere a la capacidad de asignar una probabilidad de que ocurran determinadas situaciones en el transcurso de la enfermedad de Chagas, cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el análisis de la cantidad de anticuerpos frente al péptido de la invención y en la comparación de la cantidad detectada con una cantidad de referencia. Esta asignación, tal y como es entendida por un experto en la materia, no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sea clasificada correctamente. Este término se refiere, por ejemplo, pero sin limitarse, a la probabilidad de desarrollar o padecer una patología cardíaca o a la probabilidad de desarrollar o padecer una patología digestiva, así como a la predicción de respuesta a un determinado tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Una “muestra biológica aislada” se refiere, pero sin limitarnos, a células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada es un fluido biológico como, por ejemplo, pero sin limitarse, sangre, plasma o suero sanguíneo. Más preferiblemente, el fluido biológico es el suero sanguíneo. La detección de anticuerpos frente al péptido de la invención en una muestra biológica aislada de un individuo es indicativa de que ha estado o continúa parasitado por *T. cruzi*. El término “individuo”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término “individuo” no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo, condición física y ser originario y/o proceder de cualquier parte del mundo.

Los organismos de la especie *Trypanosoma cruzi* pertenecen al Superreino *Eukaryota*, Orden *Kinetoplastida*, Familia *Trypanosomatidae*, Género *Trypanosoma* y subgénero *Schizotrypanum*.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas, que comprende:

- a. detectar la existencia y/o cuantificar la cantidad de anticuerpos frente al péptido de la invención en una muestra biológica aislada, al poner en contacto dicho péptido con dicha muestra.

En una realización preferida de la invención, el método de obtención de datos útiles que además comprende:

- b. comparar la cantidad de anticuerpos cuantificados en el paso (a) con una cantidad de referencia.

En una realización más preferida, el método de obtención de datos útiles para el diagnóstico o seguimiento de la enfermedad de Chagas, además comprende:

- c. asignar al individuo de la muestra al grupo de individuos con enfermedad de Chagas, cuando presenta una cantidad de anticuerpos cuantificados en el paso (a), mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

La medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración de los anticuerpos, basada en una señal que se obtiene directamente de los anticuerpos, y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de anticuerpos presente en la muestra. Dicha señal - a la que también podemos referirnos como señal de intensidad - puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos anticuerpos. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiquetas" o productos de reacción enzimática).

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación al antígeno al que se unen específicamente (inmunorreacciona) el cual puede ser un péptido natural o sintetizado químicamente o una proteína natural o recombinante, producida y purificada por técnicas moleculares y químicas. Hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE).

El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de anticuerpos frente al péptido de la invención en la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de anticuerpos frente al péptido de la invención de una o varias muestras de referencia. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (b) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o automáticamente y/o asistida por ordenador.

El término "cantidad de referencia", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad absoluta o relativa de anticuerpos frente al péptido de la invención que permite discriminar un determinado estadio de la enfermedad de Chagas de los otros estadios de la enfermedad. Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, la muestra de referencia pueden ser los controles negativos, esto es, las cantidades detectadas por el método de la invención en muestras de individuos que no han sido parasitados por *T. cruzi*. También, por ejemplo, en el caso de la obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas crónica, la cantidad de referencia sería la cantidad de los anticuerpos frente al péptido de la invención detectada en pacientes con enfermedad de Chagas indeterminada. Además, en el caso del seguimiento de la evolución de la enfermedad de Chagas, la cantidad de referencia podría ser, pero sin limitarnos, la cantidad de estos anticuerpos detectados en una muestra biológica del mismo individuo obtenida con anterioridad.

Así pues, la muestra o muestras de referencia pueden ser, por ejemplo, obtenidas a partir del suero de un paciente con enfermedad de Chagas en una determinada fase clínica. En otra realización preferida de este aspecto de la presente invención, la cantidad de referencia se obtiene a partir de una muestra de referencia. La cantidad de referencia puede obtenerse también, por ejemplo, de los límites de distribución normal de una cantidad encontrada en muestras obtenidas de una población de pacientes con enfermedad de Chagas en distintas fases, mediante técnicas estadísticas bien conocidas.

La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

Otro aspecto de la invención es un método para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas que comprende los pasos (a) y (b) del método de obtención de datos útiles de la invención, que además comprende:

- c'. asignar al individuo de la muestra al grupo de individuos con enfermedad de Chagas en fase crónica con patología cardíaca o digestiva cuando presenta una cantidad de anticuerpos cuantificados en el paso (a), mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia, o

- c''. asignar al individuo de la muestra al grupo de individuos con enfermedad de Chagas en fase indeterminada cuando presenta una cantidad de anticuerpos cuantificados en el paso (a), menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

El término “diagnóstico diferencial”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la discriminación, dentro de los enfermos de Chagas, de los pacientes crónicos, con patologías cardíaca y/o digestiva, de los pacientes indeterminados.

5 Otro aspecto de la invención es un método de seguimiento de la evolución de la enfermedad de Chagas en individuos chagásicos crónicos con cardiopatías que comprende realizar al menos dos veces la secuencia de pasos (a) y (b) del método de obtención de datos útiles de la invención, en muestras biológicas procedentes de un mismo individuo, y aisladas en momentos diferentes. Preferiblemente, el método de seguimiento se realiza post-tratamiento.

10 El término “seguimiento de la evolución”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, a la supervisión del desarrollo de la enfermedad, como por ejemplo, pero sin limitarse, la evaluación de la respuesta a un determinado tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Preferiblemente, el método de seguimiento de la evolución de la enfermedad de Chagas además comprende com-
15 parar la cantidad de anticuerpos cuantificados en el paso (a) antes del inicio del tratamiento, con la cantidad de anticuerpos cuantificados en el paso (a) en distintos momentos tras el inicio del tratamiento.

Preferiblemente, la cuantificación de los anticuerpos se realiza mediante un inmunoensayo. Preferiblemente, el
20 inmunoensayo es un ELISA. Preferiblemente, el ELISA es un ELISA indirecto.

Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immuno-*
blot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA),
inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o *microarrays* de proteínas. El ELISA se basa en la premisa de que un
25 inmunorreactivo puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich. El término “compuesto marcador”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiac-
30 tiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y/o cuantificación de la cantidad de anticuerpos. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ^{32}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa por colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía, respectivamente.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a un kit (en adelante llamado kit de la invención) que comprende el péptido de la invención para cuantificar los anticuerpos frente a dicho péptido en una muestra biológica aislada. Preferiblemente, el péptido está inmovilizado en una fase sólida.

40 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para el diagnóstico diferencial del estadio de la enfermedad de Chagas.

45 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para el seguimiento de la enfermedad de Chagas tras el inicio del tratamiento.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir
50 otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

55 Figura 1. Muestra la reactividad de sueros de pacientes chagásicos frente al péptido 3973. Se emplearon 50 sueros de pacientes de enfermedad de Chagas y 28 sueros de donantes sanos (C-, de control negativo). Los sueros de pacientes de enfermedad de Chagas reconocen de forma significativamente superior ($p < 0,001$) dicho péptido en relación con los donantes sanos. Los resultados mostrados son aquellos obtenidos a una dilución de los sueros de
60 1:800.

Figura 2. Muestra la especificidad de la respuesta serológica frente al péptido 3973 (enfermedades infecciosas afi-
65 nes). Se emplearon 50 sueros de pacientes de enfermedad de Chagas, 5 de pacientes con leishmaniasis, 5 de pacientes con tuberculosis, 4 de pacientes con malaria y 28 sueros de donantes sanos (C-, de control negativo). Los sueros de los enfermos de Chagas reconocen el péptido 3973 de forma significativamente superior ($p \leq 0,001$) que los de los enfermos de otras patologías infecciosas. Los resultados mostrados son aquellos obtenidos a una dilución de los sueros de 1:800.

Figura 3. Muestra el reconocimiento del péptido 3973 dependiendo de la patología chagásica asociada. Se emplearon 50 sueros de pacientes de enfermedad de Chagas, de los cuales 30 estaban en fase indeterminada (IND), 30 en fase crónica con patología cardíaca (CARD) y 21 en fase crónica con patología digestiva (DIG). Los sueros de los pacientes con cardiopatía crónica chagásica o digestiva reconocen el péptido 3973 de forma significativamente superior ($p \leq 0,001$ en ambos casos) al de los pacientes en fase indeterminada. Los resultados mostrados son aquellos obtenidos a una dilución de los sueros de 1:1.600.

Figura 4. Muestra la especificidad de la respuesta serológica frente al péptido 3973 (otras cardiopatías). Los sueros de los enfermos con cardiopatía crónica chagásica o digestiva presentan un reconocimiento del péptido 3973 significativamente superior al de los enfermos que presentan otras cardiopatías no chagásicas ($p < 0,001$). Los resultados mostrados son aquellos obtenidos a una dilución de los sueros de 1:1.600.

Figura 5. Muestra la reactividad de los sueros de 23 pacientes chagásicos al péptido 3973 antes y durante el tratamiento con benznidazol (a los 3, 6, 9, y 12 meses de tratamiento). Sólo los enfermos de Chagas con cardiopatía chagásica crónica presentaron una disminución significativa del reconocimiento del péptido 3973 ($p < 0,05$ a los 6 meses, $p < 0,1$ a los 9 meses y $p < 0,02$ a los 12 meses de tratamiento). Los resultados mostrados son aquellos obtenidos a una dilución de los sueros de 1:1.600.

Ejemplos

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los métodos de la invención para obtener datos útiles en el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas y para el seguimiento de dicha enfermedad.

Materiales y Métodos

Sujetos del estudio

Los sujetos de estudio, procedentes de distintos países de América Latina y residentes en España, fueron diagnosticados como enfermos de Chagas o donantes sanos, mediante dos técnicas serológicas convencionales. Los enfermos de Chagas fueron sometidos a diferentes pruebas médicas como electrocardiograma, radiografía de tórax, ecocardiografía y radiografía digestiva con contraste (casos digestivos) para la valoración clínica en detalle. Los resultados de las mencionadas pruebas permitieron clasificar clínicamente a los pacientes según la fase de la enfermedad en asintomáticos o indeterminados (IND), con patología cardíaca (CARD) o digestiva (DIG). Se les tomaron muestras de suero antes del inicio del tratamiento con benznidazol y a los 3, 6, 9 y 12 meses posteriores al inicio del tratamiento. Los sujetos con cardiopatía no chagásica son residentes en España y procedentes de zonas no endémicas.

Secuenciación y síntesis del péptido

El péptido 3973 se obtuvo mediante síntesis múltiple en fase sólida (SMPS) usando resina p-metilbenzhdilamida (MBHA) (Houghten, Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 82(15):5131 -5). La pureza del péptido se analizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), de acuerdo con el método descrito previamente (Hunkapiller y Hood, Biochemistry. 1978 30; 17 (11):2124-33).

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Los niveles de anticuerpos IgG específicos frente al péptido 3973 se determinaron en sueros chagásicos y sueros de donantes sanos, así como en sueros de individuos sufriendo enfermedades infecciosas que puedan coexistir territorialmente con la de Chagas. Brevemente, los pocillos de ELISA (Nunc) se cubrieron con $10 \mu\text{g/ml}$ del péptido 3973 disuelto en PBS (del inglés "Phosphate Buffer Saline" o tampón fosfato, a $\text{pH}=7,2$) y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Posteriormente, los pocillos se lavaron dos veces con $200 \mu\text{l}$ de PBS-0,05% Tween-20 y se incubaron durante 30 minutos con solución bloqueante (2,5% de leche en polvo desnatada en PBS-0,05% Tween-20). Después, se añadieron los sueros de pacientes diluidos en solución bloqueante y se incubaron durante 1 hora a 37°C . Como anticuerpo secundario, se utilizó el anticuerpo anti-IgG conjugado a peroxidasa (Biosource) a una dilución 1:2.000 y se incubó durante una hora a 31°C . Tras lavar los pocillos, la reacción se reveló con una mezcla de volúmenes iguales de tetrametilbenzidina (TMB 0,4 g/l) y agua oxigenada (H_2O_2 0,02%) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 620 nm. Los sueros se ensayaron por triplicado y en tres diluciones (1:400, 1:800 y 1:1.600). En cada ensayo se incluyeron los correspondientes controles positivos (fijación de péptido a la placa, reactividad de suero frente al péptido fijado y revelado de la reacción) y negativos (fondo de la reacción), y se desecharon aquellos ensayos en los que las densidades ópticas (D.O.) de los controles fueron más de un 20% diferentes a los valores esperados.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa SPSS 15.0. Las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de pacientes se analizaron utilizando el test no paramétrico de Mann-Withney. El análisis de las diferencias longitudinales post-tratamiento se realizó con el método no paramétrico de Wilcoxon. Se considera que las diferencias son estadísticamente significativas si el intervalo de confianza es de al menos un 90% ($p \leq 0,1$).

Ejemplo 1

Reactividad de sueros de pacientes chagásicos frente al péptido 3973 y otros péptidos con fórmula F-X₁-Q-X₂-DKP-X₃

Se analizó, mediante ELISA, la presencia de anticuerpos específicos así como el título de anticuerpos frente a un péptido sintético, de tamaño menor de 20 aminoácidos, cuya secuencia se corresponde a una parte de la proteína de membrana de *T. cruzi* (TcMp) (Tabla 1). Se determinó que este era reconocido, de manera específica, por más del 95% de los sueros de individuos chagásicos (Tabla 1). Igualmente, se estudió la secuencia concreta frente a la cual van dirigidos específicamente los anticuerpos detectados, analizando mediante ELISA la presencia y nivel de anticuerpos frente a 19 diferentes péptidos cuyas secuencias se corresponden a la del péptido 3973 (Tabla 1) pero que además portan una o varias modificaciones en la secuencia de aminoácidos.

Los resultados obtenidos mostraron que 7 de estos péptidos eran reconocidos de igual manera y porcentaje (95%) por los sueros de los pacientes chagásicos y que, en 12 de los péptidos, el nivel de reconocimiento disminuyó desde un 50% hasta menos de un 5% (Tabla 1). Por tanto, los resultados obtenidos y representados en la Tabla 1 pusieron de manifiesto la existencia de una secuencia de 12 aminoácidos, que es reconocida mediante ELISA y de forma estadísticamente significativa por más de un 95% de los sueros de los enfermos de Chagas y no por los sueros procedentes de donantes sanos. Además, los resultados obtenidos y mostrados en la Tabla 1 evidencian la identidad y posición relativa de 5 aminoácidos contenidos en el péptido 3973 que están implicados en el mencionado reconocimiento y que son responsables del mismo.

TABLA 1

Tabla de reactividad de péptidos análogos a 3973. "N" indica que el péptido es una molécula natural y "Q" indica que se trata de una molécula quimérica

Péptido	Secuencia	Pm	% de reactividad
3973 N	(SEQ ID NO: 1) FGQAAAGDKPSL	1053,4	>95%
3972 N	(SEQ ID NO: 2) FGQAAAGDKPPP	1047,3	>95%
16303 N	(SEQ ID NO: 3) FGQAAAGDKPAP	1327,38	>95%
3963 N	(SEQ ID NO: 9) FGQAAAGDKLSL	1069,5	30%
3974 N	(SEQ ID NO: 10) FGQAAAGDLPSP	1022,3	<10%
3964 N	(SEQ ID NO: 11) FGQAAAGHKPAP	1043,4	20%
3966 N	(SEQ ID NO: 4) FGQAAAADKPSL	1067,4	>95%
3965 N	(SEQ ID NO: 5) FGQAAEGDKPPP	1047,3	>95%
16304 N	(SEQ ID NO: 6) FAQAAAADKPSL	1387,37	>95%

5	6174 Q	(SEQ ID NO: 12) FGQAAAGDGPSL	1090,3	<5%
	6173 Q	(SEQ ID NO: 13) FGQAAAGGKPSL	1103,4	<5%
	6172 Q	(SEQ ID NO: 14) FGQAAAGERPSL	1203,4	<5%
10	6381 Q	(SEQ ID NO: 15) AAAAA AGDKPAA	998,3	<5%
	6382 Q	(SEQ ID NO: 16) AAQ AAAGDKPSL	1056,4	<10%
15	6175 Q	(SEQ ID NO: 17) AGQ AAAGDKPSL	1085,3	50%
	6380 Q	(SEQ ID NO: 7) FAQ AAAGDKPSL	1189,4	>95%
	6383 Q	(SEQ ID NO: 18) FGA AAAGDKPSL	1104,5	<10%
20	6384 Q	(SEQ ID NO: 19) AAGDKPSL FGQA	1161,4	<5%
	6385 Q	(SEQ ID NO: 20) QAAAGDKPSL FG	1161,4	<5%
25	6386 Q	(SEQ ID NO: 8) FAQ AAAADKPAA	1329,38	>95%

Ejemplo 2

30 *La respuesta serológica frente al péptido 3973 es específica de la enfermedad de Chagas frente a otras enfermedades infecciosas afines.*

Se ensayó la reactividad frente al péptido 3973 de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (50 pacientes) y 28 sujetos donantes sanos (denominados controles negativos o C-), observando que el reconocimiento del péptido 3973, por parte de los enfermos de Chagas, es significativamente superior ($p < 0,001$) al de los donantes sanos (Fig 1). Así mismo, se ensayó la reactividad frente al péptido 3973 de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (50 pacientes) y otras patologías infecciosas afines y endémicas de las regiones en las que se encuentra la enfermedad de Chagas, como son la leishmaniasis (5 pacientes), la tuberculosis (5 pacientes) o la malaria (4 pacientes). El reconocimiento del péptido 3973, por parte de los enfermos de Chagas, es significativamente superior ($p < 0,001$) al de los enfermos de otras patologías infecciosas endémicas de las regiones afectadas. Igualmente, no se observó un reconocimiento serológico significativo de dicho péptido por parte de sueros de pacientes con patologías infecciosas afines, que presentaron unos niveles parecidos a los de los donantes sanos (Fig. 2).

Ejemplo 3

45 *La respuesta serológica frente al péptido 3973 permite discriminar el estadio de la enfermedad de Chagas*

Sueros de pacientes con enfermedad de Chagas se ensayaron frente al péptido 3973 y los valores de D.O. se representaron atendiendo a la patología de cada paciente (fase crónica con cardiopatías (CARD), fase crónica con patología digestiva (DIG) y fase indeterminada (IND). Puede observarse el reconocimiento significativo del péptido 3973 por parte de los enfermos de Chagas independientemente del estadio de la enfermedad. Igualmente, se observa que los pacientes con patología asociada como es cardiopatía crónica chagásica (30 pacientes) o digestiva (21 pacientes) reconocen dicho péptido de forma significativamente superior ($p < 0,001$) al de los pacientes de Chagas que aparentemente no tienen una patología asociada (30 pacientes) (Fig. 3).

Ejemplo 4

60 *La respuesta serológica frente al péptido 3973 es específica de la enfermedad de Chagas en estadio crónico y con patología evidenciada y no de otras enfermedades no chagásicas que tienen asociadas cardiopatías*

50 sueros de pacientes con enfermedad de Chagas se ensayaron frente al péptido 3973 y los valores de D.O. se representaron agrupados atendiendo a la ausencia o presencia de patología chagásica de cada paciente: IND: pacientes en fase indeterminada sin síntomas aparentes; CARD: con cardiopatía chagásica crónica; DIG: con patología de tipo digestivo. También se incluyeron pacientes con cardiopatías no chagásicas. Los resultados obtenidos muestran que el reconocimiento del péptido 3973 por parte de los enfermos con cardiopatía crónica chagásica o digestiva es significativamente superior al de los enfermos que presentan otras cardiopatías no chagásicas (Fig. 4).

Ejemplo 5

Las modificaciones en el reconocimiento del péptido 3973 inducidas por el tratamiento con benznidazol dependen de la patología chagásica asociada

5 50 sueros de pacientes con enfermedad de Chagas se ensayaron frente al péptido 3973 antes del inicio del tratamiento con benznidazol (T0) y, para 23 pacientes, a intervalos regulares de 3 meses tras el inicio del tratamiento (a los 3, 6, 9 y 12 meses post-tratamiento). Los pacientes se agruparon atendiendo a la patología chagásica asociada: patología cardíaca, digestiva o en pacientes indeterminados sin patología aparente. Se observó una disminución significativa
10 en el reconocimiento del péptido 3973 a los 6 meses ($p<0,05$), 9 meses ($p<0,1$) y 12 meses ($p<0,02$) post-tratamiento, únicamente en los enfermos con cardiopatía chagásica crónica (Fig. 5).

15

20

25

30

35

40

45

50

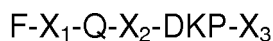
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de secuencia aminoacídica:



Donde: X_1 representa un aminoácido que se selecciona de entre G y A; donde X_2 es un grupo de 4 aminoácidos que se seleccionan de entre A, E y G; donde X_3 es un grupo de 2 aminoácidos que se seleccionan de entre S, L, P y A.

2. El péptido según la reivindicación anterior, donde X_1 es G.

3. El péptido según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, donde X_1 es A.

4. El péptido según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores, donde X_2 es AAX₄ y X_4 es un grupo de dos aminoácidos que se seleccionan de entre A, E y G.

5. El péptido según la reivindicación anterior, donde X_4 es AA, AG o EG.

6. El péptido según cualquiera de las cinco reivindicaciones anteriores, donde X_3 es SL, PP, AP o AA.

7. El péptido según cualquiera de las seis reivindicaciones anteriores, donde la secuencia aminoacídica del péptido es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

8. El péptido según cualquiera de las siete reivindicaciones anteriores, donde la secuencia aminoacídica del péptido es SEQ ID NO: 1.

9. Un péptido **caracterizado** porque su secuencia aminoacídica comprende la secuencia aminoacídica del péptido según cualquiera de las ocho reivindicaciones anteriores.

10. El péptido según la reivindicación anterior **caracterizado** porque su secuencia está repetida al menos dos veces.

11. Un uso del péptido según cualquiera de las diez reivindicaciones anteriores como marcador para el diagnóstico diferencial, pronóstico o seguimiento del estadio de la enfermedad de Chagas en una muestra biológica aislada.

12. Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas, que comprende:

- a. detectar la existencia y/o cuantificar la cantidad de anticuerpos frente al péptido según las reivindicaciones 1 a 10 en una muestra biológica aislada, al poner en contacto dicho péptido con dicha muestra.

13. El método según la reivindicación anterior, que además comprende:

- b. comparar la cantidad de anticuerpos cuantificados en el paso (a) con una cantidad de referencia.

14. El método según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores para el diagnóstico o seguimiento de la enfermedad de Chagas, que además comprende:

- c. asignar al individuo de la muestra al grupo de individuos con enfermedad de Chagas, cuando presenta una cantidad de anticuerpos cuantificados en el paso (a), mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

15. Un método para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas que comprende los pasos (a) y (b) según cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13, que además comprende:

- c'. asignar al individuo de la muestra al grupo de individuos con enfermedad de Chagas en fase crónica con patología cardíaca o digestiva cuando presenta una cantidad de anticuerpos cuantificados en el paso (a), mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia, o
- c''. asignar al individuo de la muestra al grupo de individuos con enfermedad de Chagas en fase indeterminada cuando presenta una cantidad de anticuerpos cuantificados en el paso (a), menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

16. El método de seguimiento de la evolución de la enfermedad de Chagas en individuos chagásicos crónicos con cardiopatías que comprende realizar al menos dos veces la secuencia de pasos (a) y (b) según cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13, en muestras biológicas procedentes de un mismo individuo, y aisladas en momentos diferentes.

17. El método de seguimiento según la reivindicación anterior, donde el seguimiento se realiza post-tratamiento.

18. El método de seguimiento según la reivindicación anterior, que además comprende comparar la cantidad de anticuerpos cuantificados en el paso (a) antes del inicio del tratamiento, con la cantidad de anticuerpos cuantificados en el paso (a) en distintos momentos tras el inicio del tratamiento.

19. El método según cualquiera de las siete reivindicaciones anteriores, donde la cuantificación de los anticuerpos se realiza mediante un ELISA.

20. El método según la reivindicación anterior, donde el ELISA es un ELISA indirecto.

21. Un kit que comprende el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para cuantificar los anticuerpos frente a dicho péptido en una muestra biológica aislada.

22. El kit según la reivindicación anterior donde el péptido está inmovilizado en una fase sólida.

23. Uso del kit según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

24. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 21 y 22 para el diagnóstico diferencial del estadio de la enfermedad de Chagas.

25. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 21 y 22 para el seguimiento de la enfermedad de Chagas tras el inicio del tratamiento.

Figura 1

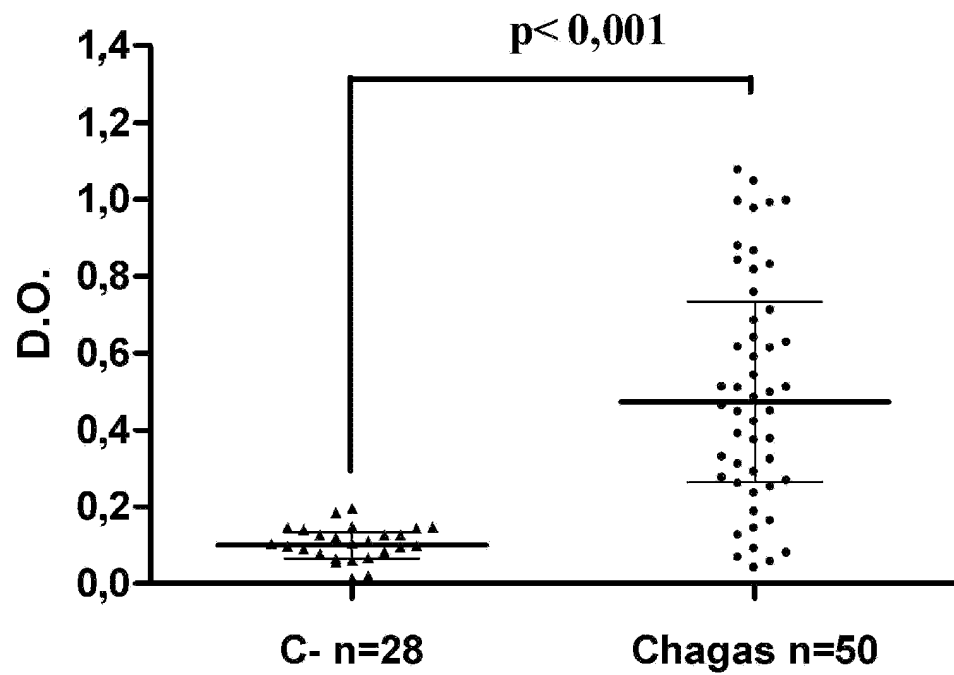


Figura 2

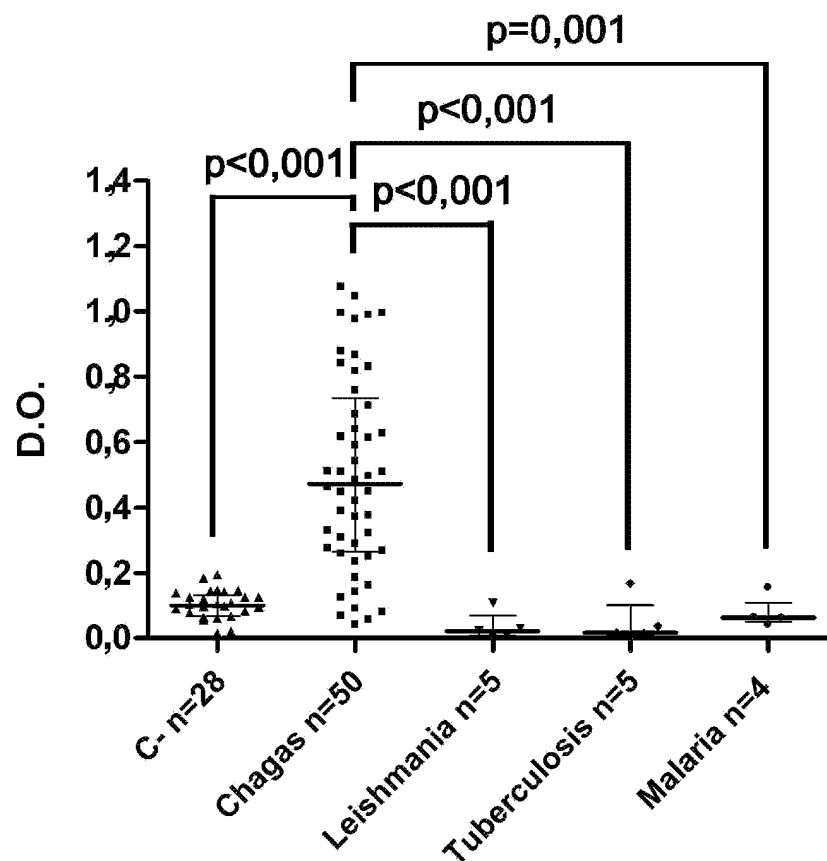


Figura 3

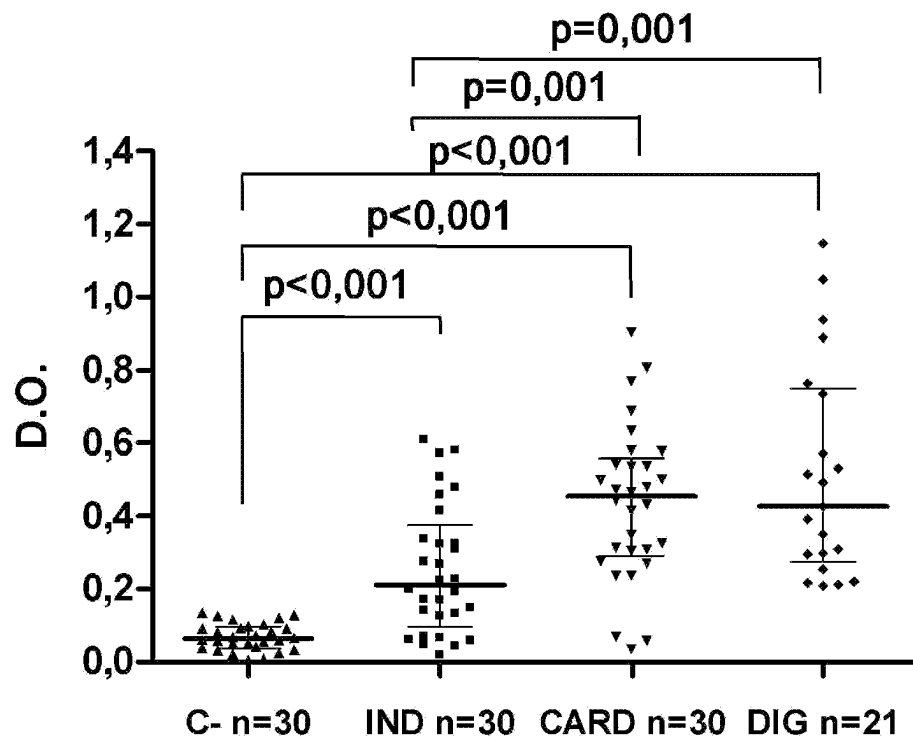


Figura 4

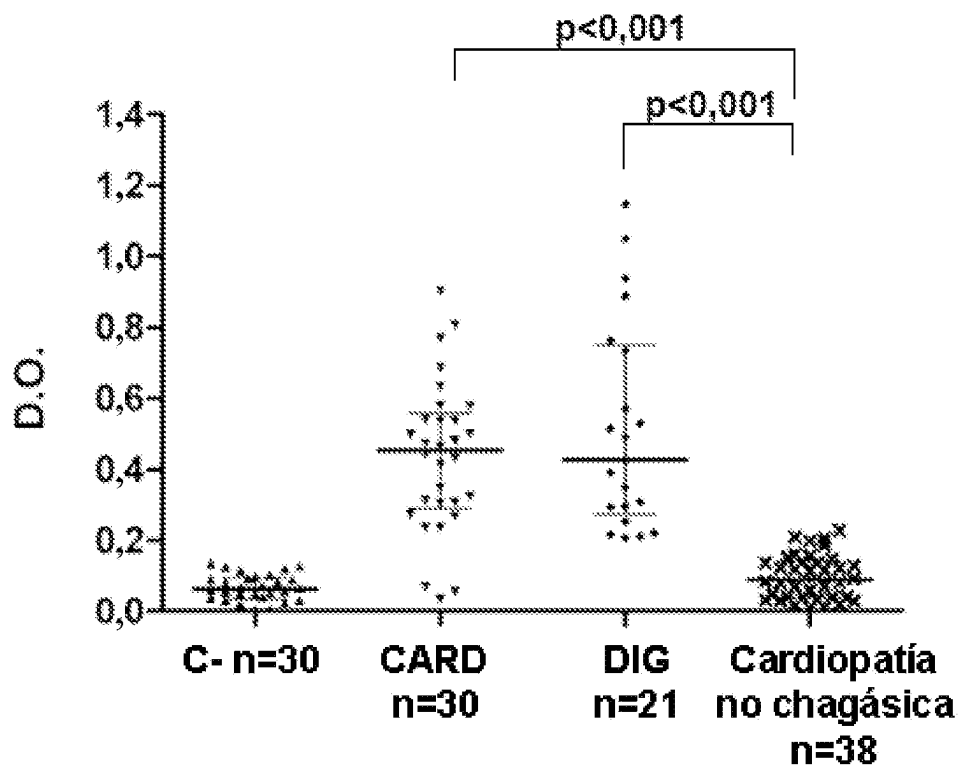
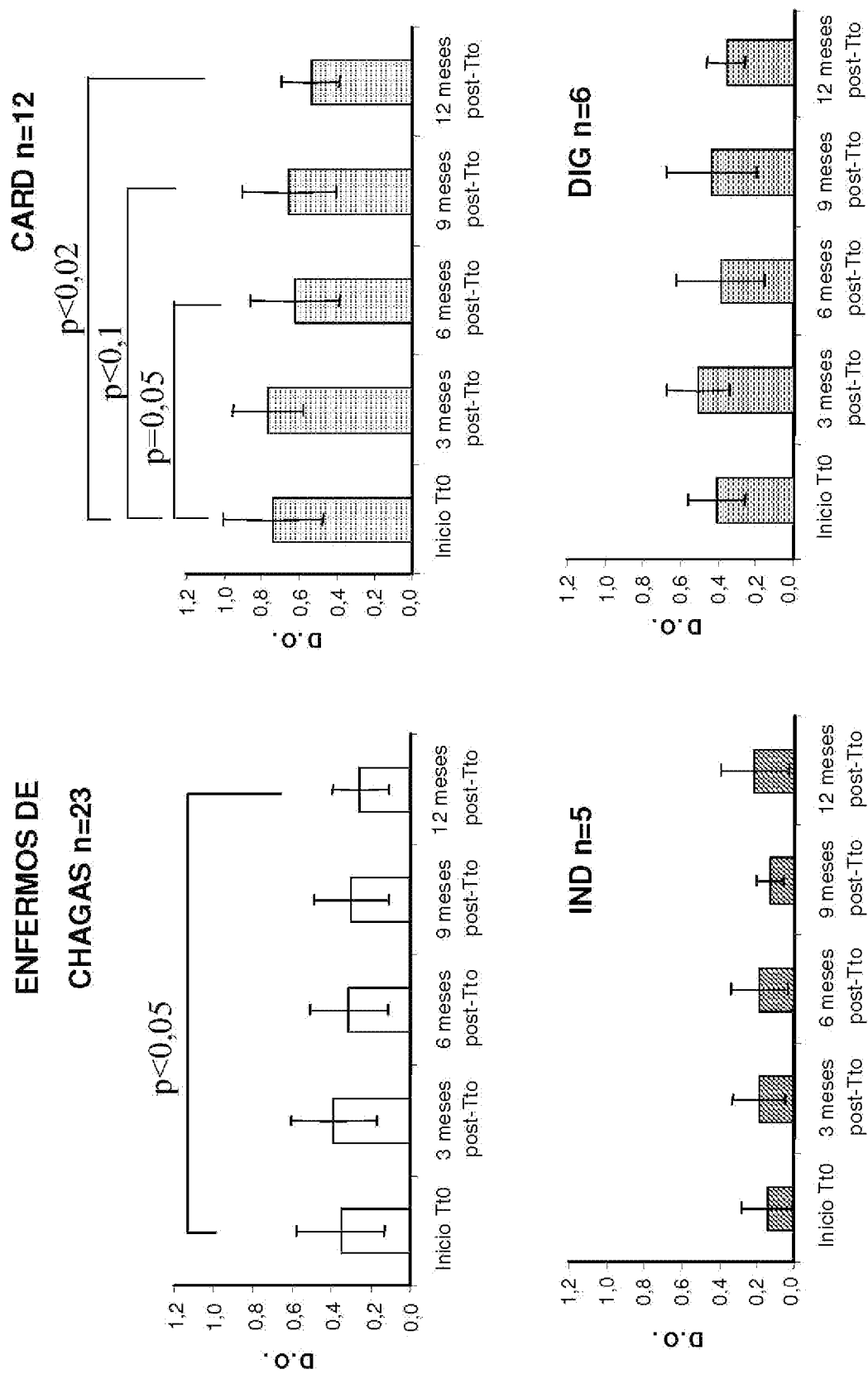


Figura 5



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
 Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia (FFIS)

<120> Método de diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas

<130> ES1641.749

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 1
 Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu
 1 5 10

<210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 2
 Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro
 1 5 10

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 3
 Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ala Pro
 1 5 10

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 4
 Phe Gly Gln Ala Ala Ala Ala Asp Lys Pro Ser Leu
 1 5 10

<210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Trypanosoma cruzi*

ES 2 373 262 B1

<400> 5

5 Phe Gly Gln Ala Ala Glu Gly Asp Lys Pro Pro Pro
1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

10 <213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 6

15 Phe Ala Gln Ala Ala Ala Ala Asp Lys Pro Ser Leu
1 5 10

<210> 7

20 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Péptido de *T. cruzi* modificado de forma que el segundo aminoácido es A en lugar de G.

<400> 7

30 Phe Ala Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu
1 5 10

35 <210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Péptido de *T. cruzi* modificado de forma que los aminoácidos 2, 7, 11 y 12 son A.

45 <400> 8

Phe Ala Gln Ala Ala Ala Ala Asp Lys Pro Ala Ala
1 5 10

50

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

55 <213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 9

60 Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Leu Ser Leu
1 5 10

<210> 10

65 <211> 12

<212> PRT

<213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 10
Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Leu Pro Ser Pro
1 5 10

5 <210> 11
<211> 12
<212> PRT
10 <213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 11
Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly His Lys Pro Ala Pro
15 1 5 10

<210> 12
<211> 12
20 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> Péptido de *T. cruzi* modificado de forma que el noveno aminoácido es G en lugar de K.

<400> 12
Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Gly Pro Ser Leu
30 1 5 10

<210> 13
<211> 12
35 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
40 <223> Péptido de *T. cruzi* modificado de forma que el octavo aminoácido es G en lugar de D.

<400> 13
Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Gly Lys Pro Ser Leu
45 1 5 10

<210> 14
<211> 12
50 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
55 <223> Péptido de *T. cruzi* modificado de forma que los aminoácidos octavo y noveno son E y R en lugar de D y K.

<400> 14
Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Glu Arg Pro Ser Leu
60 1 5 10

<210> 15
<211> 12
65 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 373 262 B1

<220>

<223> Péptido de *T. cruzi* modificado de forma que los aminoácidos en las posiciones 1, 2, 3 y 11 son A.

5 <400> 15

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ala Ala
1 5 10

10 <210> 16

<211> 12

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de *T. cruzi* modificado de forma que los dos primeros aminoácidos son A.

20 <400> 16

Ala Ala Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu
1 5 10

25 <210> 17

<211> 12

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Péptido de *T. cruzi* modificado de forma que el primer aminoácido es A.

<400> 17

40 Ala Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu
1 5 10

<210> 18

<211> 12

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Péptido de *T. cruzi* modificado de forma que el tercer aminoácido es A.

<400> 18

55 Phe Gly Ala Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu
1 5 10

<210> 19

60 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Péptido de *T. cruzi* modificado de forma que los cuatro primeros aminoácidos se sitúan en el extremo carboxilo del péptido.

ES 2 373 262 B1

<400> 19

Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu Phe Gly Gln Ala
1 5 10

5

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Péptido de *T. cruzi* modificado de forma que los dos primeros aminoácidos se sitúan en el extremo carboxilo del péptido.

<400> 20

Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Leu Phe Gly
1 5 10

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031097

②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.07.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/569** (2006.01)
C07K7/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	IBAÑEZ C. et al., "Multiple Trypanosoma cruzi antigens containing tandemly repeated amino acids sequence motifs". Molecular and Biochemical Parasitology (1988) 30, 27-34.	1-10,21-23
A		11-20,24-25
X	HOFT D. et al., "Trypanosoma cruzi expresses diverse repetitive protein antigens". Infection and Immunity (1989), vol. 57, nº 7, pág. 1959-1967.	1-20,21-23
A		11-20,24-25
X	GRUBER A. et al., " Trypanosoma cruzi: Characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease" Experimental Parasitology (1993) vol. 76, nº 1, pág. 1-12.	1-10,21-23
A		11-20,24-25
X	DURANTI M.A. et al., " Trypanosoma cruzi: conformational preferences of antigenic peptides bearing the immunodominant epitope of the B13 antigen". Experimental parasitology (1999), vol. 93, nº 1, pág. 38-44. Todo el documento.	1-10,21-23
A		11-20,24-25
X	PEREIRA C. M. et al., "Epitope mapping of a single repetitive unit of the B13 Trypanosoma cruzi antigen as fusions to Escherichia coli LamB protein". FEMS Microbiology Letters (2004), 235, 237-242. Todo el documento.	1-10,21-23
A		11-20,24-25
X	ABEL L.C.J. et al., " T cell epitope characterization in tandemly repetitive Trypanosoma cruzi B13 protein". Microbes and Infection (2005), 7,1184-1195. Todo el documento.	1-10,21-23
A		11-20,24-25
A	WO 2009158729 A2 (INFECTIOUS DISEASE RES INST) 30.12.2009	1-25
A	EP 0976763 A1 (INNOGENETICS NV) 02.02.2000	1-25
A	WO 0050897 A1 (CORIXA CORP) 31.08.2000	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.01.2012

Examinador
M. Hernandez Cuellar

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.01.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 11-20,24-25	SI
	Reivindicaciones 1-10,21-23	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	IBAÑEZ C. et al., "Multiple Trypanosoma cruzi antigens containing tandemly repeated amino acids sequence motifs". Molecular and Biochemical Parasitology (1988) 30, 27-34.	
D02	HOFT D. et al., "Trypanosoma cruzi expresses diverse repetitive protein antigens". Infection and Immunity (1989), vol. 57, nº 7, pág. 1959-1967.	
D03	GRUBER A. et al., " Trypanosoma cruzi: Characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease" Experimental Parasitology (1993) vol. 76, nº 1, pág. 1-12.	
D04	DURANTI M.A. et al., " Trypanosoma cruzi: conformational preferences of antigenic peptides bearing the immunedominant epitope of the B13 antigen". Experimental parasitology (1999), vol. 93, nº 1, pág. 38-44. Todo el documento.	
D05	PEREIRA C. M. et al., " Epitope mapping of a single repetitive unit of the B13 Trypanosoma cruzi antigen as fusions to Escherichia coli LamB protein". FEMS Microbiology Letters (2004), 235, 237-242. Todo el documento.	
D06	ABEL L.C.J. et al., "T cell epitope characterization in tandemly repetitive Trypanosoma cruzi B13 protein". Microbes and Infection (2005), 7, 1184-1195. Todo el documento.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere a péptidos sintéticos utilizados como marcadores de la enfermedad de Chagas así como un método de diagnóstico diferencial de los estadios crónico (con alteraciones cardíacas o digestivas), del estadio indeterminado que permite establecer grupos de pacientes según el grado de la patología y hacer un seguimiento y evaluar la respuesta al tratamiento y evolución de dicha enfermedad en pacientes con cardiopatía chagásica. Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende el marcador y al uso del kit para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Debido al amplio alcance de las reivindicaciones 1-6 la búsqueda se ha centrado en las secuencias SEQ ID NO 1-8. Asimismo la búsqueda de las reivindicaciones 9-25 relativas al método y kit se ha centrado en el ejemplo descrito en la memoria que se basa en SEQ ID NO 1 y que se considera el objeto de la invención de las mencionadas reivindicaciones.

1.- NOVEDAD

Ninguno de los documentos citados en el informe de búsqueda internacional describe péptidos idénticos a los reivindicados en la solicitud. En este sentido, se considera que las reivindicaciones 1-25 son nuevas y cumplen el requisito establecido en el Art. 6.1 LP

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

La presente solicitud plantea como problema técnico el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas y propone como solución a dicho problema 8 marcadores identificados en la solicitud con las secuencias SEQ ID NO 1-8. Estos péptidos sintéticos corresponden al antígeno de membrana B13 del tripomastigote de Trypanosoma cruzi.

De acuerdo con el estado de la técnica establecido por el informe de búsqueda internacional, el antígeno B13 es conocido en el estado de la técnica desde finales de los años 80.

El documento D01 describe múltiples antígenos de T. cruzi que contienen secuencias de aminoácidos repetidas en tándem. En la figura 3 de la página 30 se describe el clon #2 de 36 pb que origina una secuencia de 12aa que constituye la unidad repetitiva característica de este antígeno y además incluye posibles variaciones en distintas posiciones de la secuencia.

Por su parte el documento D02 también describe varios antígenos de T. cruzi. En particular en la figura 1 de la página 1960 de describe el antígeno TCR39 correspondiente a la secuencia repetitiva de 12 aa: PFQAAAGDKPS.

El documento D03 describe la caracterización de dos antígenos recombinantes con potencial aplicación en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En concreto en la Fig. 1 de la página 4 se describe el clon B13 correspondiente a la secuencia repetitiva de 12 aa : PPFQAAAGDKP y las posibles variaciones de algunas de las posiciones.

El documento D04 analiza las preferencias conformacionales de los péptidos antigénicos que portan el epítipo inmunodominante del antígeno B13. Según este documento el antígeno recombinante B13 está formado por 19 copias parcialmente degeneradas repetidas en tándem de la secuencia base compuesta por 12 aa: P(L)P(S,A)P(L)FGQAAA(E)G(A)D(G)K, donde los residuos entre paréntesis se pueden encontrar sustituyendo al residuo precedente en las diferentes copias repetidas.

En el documento D05 se realiza un mapeo de los epítopos de la unidad única repetitiva del antígeno B13 de T. cruzi como proteínas de fusión de la proteína LamB de E. coli.

Los autores de este artículo han expresado dos secuencias derivadas de B13 en el sistema LamB y se ha comprobado la antigenicidad de las proteínas de fusión. En la Tabla 1 se relacionan las dos proteínas de fusión y los distintos péptidos sintéticos utilizados. En el caso de la proteína B13.2 la secuencia utilizada fue FGQAAAGDKPSP que difiere en el último aa con respecto a las SEQ ID NO 1 y 2.

Los resultados de este estudio confirman que la secuencia FGQAAAGDK porta el epítipo inmunodominante de B13 y que los residuos que flanquean la secuencia AAAGDK modulan la interacción de los anticuerpos humanos con el antígeno B13. Todos estos resultados son relevantes tanto para el estudio de las inmunodominancias en infecciones causadas por T. cruzi como para posteriores progresos en herramientas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Finalmente el documento D06 describe la caracterización de los epítopos de células T en la proteína B13 de T. cruzi. Como parte del estudio estos autores han diseñado diferentes péptidos sintéticos que quedan recogidos en la tabla 1 de la página 1186 y en la tabla 5 de la página 1194. Uno de los péptidos de la tabla 1 es un péptido de 13 aa que coincide en sus 12 primeras posiciones con SEQ ID NO 1 y que además incorpora F como decimotercer aa. En este documento los autores también realizan un estudio del reconocimiento diferencial de diferentes variantes del epítipo de B13 mediante el análisis de la respuesta proliferativa de PBMC de individuos CCC (cardiopatía crónica chagásica) ASY (asintomáticos infectados con T. cruzi) en individuos no infectados (N).

Esta Oficina considera que un experto en la materia a la vista de la información aportada en los documentos D01-D06 afrontaría con unas expectativas razonables de éxito el diseño de los marcadores reivindicados en la solicitud. Del mismo modo se considera obvia la utilización de dichos marcadores en sistemas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-10 correspondientes a las distintas secuencias y las reivindicaciones 21-23 referentes al kit no cumplen con el requisito del Art. 8.1 LP y carecen por tanto de actividad inventiva.