

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/142829 A1

(43) Fecha de publicación internacional
16 de diciembre de 2010 (16.12.2010)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 33/569 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2010/070376

(22) Fecha de presentación internacional:

7 de junio de 2010 (07.06.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 200930302 12 de junio de 2009 (12.06.2009) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **FUNDACIÓN PARA LA FORMACIÓN E INVESTIGACIÓN SANITARIAS DE LA REGIÓN DE MURCIA** [ES/ES]; C/ Luis Fontes Pagán, 9 - 1ª Planta, E-30003 Murcia (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **LÓPEZ LÓPEZ, Manuel Carlos** [ES/ES]; Instituto De Parasitología Y Biomedicina López Neyra (ipbln), Avda. del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (Granada) (ES). **THOMAS CARAZO, M. Carmen** [ES/ES]; Instituto De Parasitología Y Biomedicina López Neyra (IPBLN), Avda. del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (Granada) (ES). **FERNÁNDEZ VILLEGAS, Ana** [ES/ES]; Instituto De Parasitología Y Biomedicina López Neyra (IPBLN), Avda. del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (Granada) (ES). **MARAÑÓN LIZANA, Concepción** [ES/ES]; Instituto De Parasitología Y Biomedicina López Neyra (IPBLN), Avda. del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (Granada) (ES). **SEGOVIA HERNÁNDEZ,**

Manuel [ES/ES]; Hospital Universitario Virgen De La Arrixaca, Ctra. Madrid-Cartagena, s/n, E-30120 El Palmar (Murcia) (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING USEFUL DATA FOR THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF CHAGAS DISEASE, AND FOR EVALUATING THE RESPONSE TO THE TREATMENT

(54) Título : MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS, Y PARA EVALUAR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining useful data for diagnosing Chagas disease, and for evaluating the response to the treatment of said disease, which can be used to establish a specific (qualitative and quantitative) individual recognition pattern that differs depending on the state of the disease and is modified post-treatment, allowing groups of patients to be established and early diagnosis in cases of vertical transmission. The invention also relates to a kit comprising the means necessary for implementing the methods of the invention.

(57) Resumen: Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, así como para evaluar la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad, que permite el establecimiento de un patrón individual de reconocimiento (cuali- y cuantitativo) específico, que es diferente dependiendo del estado de la enfermedad y se ve modificado post-tratamiento, permitiendo el establecimiento de grupos de pacientes, así como el diagnóstico precoz en casos de transmisión vertical. Kit que comprende los medios necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención.



WO 2010/142829 A1

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS, Y PARA EVALUAR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

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 de la enfermedad de Chagas, así como para evaluar la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad, que permite el establecimiento de un patrón individual de reconocimiento (cuali- y
10 cuantitativo) específico, que es diferente dependiendo del estado de la enfermedad y se ve modificado post-tratamiento, permitiendo el establecimiento de grupos de pacientes, así como el diagnóstico precoz en casos de transmisión vertical.

15 **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
20 etiológico es el protozoo *Trypanosoma 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 como consecuencia
25 de los procesos migratorios, por lo que ha sido necesario 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 1000 en Australia, 9 por 1000 en Canadá, 25 por 1000 en España y 8 a 50 por 1000 en USA. (Schmunis GA et al, 2007. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102 Suppl 1:75-85).
30

T. cruzi es un protozoo flagelado, perteneciente al Orden Kinetoplástida, siendo el único de los tripanosomas que presenta una fase obligada de multiplicación intracelular en el hospedador vertebrado. El parásito transmitido al hospedador vertebrado en las heces del insecto vector es llamado en esta etapa tripomastigote metacíclico, que es visible en la sangre como un tripomastigote fusiforme, en forma de "C" o de "S" de 20 μm de largo por 1 μm de anchura, y no tiene capacidad replicativa. Cuando el parásito infecta las fibras del músculo cardiaco estriado, fagocitos, células del músculo liso, etc...se acorta el flagelo y se transforma en un amastigote redondo de 2 a 5 μm de diámetro y con un flagelo externo muy corto o inexistente, este 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 convierten en tripomastigotes sanguíneos, que son liberados a la sangre circulante, son de un tamaño total que varía entre 15 y 20 μm , tienen flagelo libre, 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 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, se transforman en tripomastigotes metacíclicos y migran al intestino posterior de donde son excretados con las heces en el momento de la picadura.

En el caso de la infección causada por *Trypanosoma cruzi* en el hombre, la enfermedad presenta dos estados severos: la fase aguda, poco después de la infección, inaparente en la mayoría de los casos, que ocasiona la muerte en aproximadamente el 10% de los individuos, y la fase crónica que puede

desarrollarse incluso pasados más de diez años, y se caracteriza por la aparición de cardiomegalia, anormalidades electrocardiográficas, arritmias (Chagas crónico con afectación cardiaca), aperistalsis, megaesófago y megacolon (Chagas crónico con afectación digestiva), pudiendo llegar a causar la muerte. La mayoría de los casos agudos se resuelven en un periodo de dos a tres meses dando lugar a una fase crónica asintomática ahora llamada fase indeterminada, la cual se caracteriza por la persistencia de la infección sin presentar problemas clínicos aparentes, compromete cerca del 40% de los casos serológicamente positivos, y deriva en un alto porcentaje en una fase crónica sintomática varios años más tarde.

La enfermedad de Chagas es diagnosticada de forma rutinaria mediante diversos métodos serológicos comerciales, empleado las técnicas de ELISA, Inmunofluorescencia indirecta, o hemaglutinación, en los cuales se utilizan extractos completos o semipurificados de proteínas de las formas epimastigotes del parásito *Trypanosoma cruzi*, o 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). Otros métodos de diagnóstico serológico desarrollados son 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 *screening* de bancos de sangre, emergencias médicas, y en casos de trasplante de órganos. Sin embargo, sólo permiten obtener un resultado cualitativo (positivo/negativo) y, por tanto, son de baja utilidad 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 con antígenos secretores - excretos de formas tripomastigotes de *T. cruzi*.

En general, los sistemas de diagnóstico serológico permiten obtener títulos elevados en sueros de pacientes crónicos, pero resultan poco útiles para evaluar la evolución de los pacientes bajo tratamiento, ya que los títulos persisten de forma estable durante mucho tiempo. Probablemente, el tratamiento induce la disminución de la concentración de algunos anticuerpos debido a la disminución de la carga parasitaria pero, al mismo tiempo, la destrucción del parásito conduce a la exposición al sistema inmune de componentes resultantes de la destrucción parasitaria, con la consiguiente inducción 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 lisados totales o combinaciones de antígenos. Por tanto, estos kits comerciales no permiten detectar la dinámica de respuesta después del tratamiento y, por tanto, reconocer los fallos terapéuticos.

Se han detectado varios casos de Chagas congénito, en los que el parásito se transmitió *in utero* desde una madre con serología positiva para Chagas fuera de zona endémica (Munoz *et al.*, 2007. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 1161-1162; Flores-Chavez *et al.*, 2008. *Cases J* 1: 302; Muñoz *et al.*, 2009. *Acta Tropica* 111: 51-55). Según diversos estudios, la tasa de transmisión vertical de *T. cruzi* es de un 2-10% (Torrice *et al.*, 2004. *Am J Trop Med Hyg* 70: 201-209) sin embargo, el diagnóstico precoz es complicado en ausencia de una clínica clara, dado que todos los hijos de madres con serología positiva son también seropositivos al nacimiento por un fenómeno de transmisión pasiva. El aumento

o la no disminución clara de los títulos en los meses consecutivos puede ser indicio de transmisión, pero a menudo es necesario esperar un al menos dos años para poder confirmar el diagnóstico, probablemente debido al efecto de aumento y disminución compensados de los distintos anticuerpos similar al expuesto anteriormente.

Por tanto, sigue siendo fundamental el diagnóstico diferencial que permita distinguir en qué fase se encuentra la enfermedad, así como el seguimiento del transcurso de la misma, para eliminar o reducir al mínimo los procesos patológicos que causan efectos negativos, e incluso letales, en los pacientes, así como el diagnóstico precoz en el caso de transmisión vertical. Los dos únicos medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el Nifurtimox, desarrollado en 1960 por Bayer, y el 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 indeseables. Por tanto, también es necesario evaluar la evolución de los pacientes bajo tratamiento.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, así como para evaluar la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad, permitiendo el establecimiento de grupos de pacientes, así como el diagnóstico precoz en casos de transmisión vertical.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y

b) detectar la cantidad de anticuerpos frente a, al menos, dos de los antígenos que se seleccionan de la lista que comprende KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63, en la muestra biológica aislada de (a).

5 En la Fig.1 pueden visualizarse estos antígenos mediante análisis electroforético en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

En una realización preferida, el primer método de la invención comprende además:

c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención el paso (b) comprende detectar la cantidad de anticuerpos frente a, al menos, tres de los antígenos que se seleccionan de la lista que comprende KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63, en la muestra biológica aislada de (a). En otra realización más preferida de este aspecto de la invención el paso (b) comprende detectar la cantidad de los anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y

20 TGP63, en la muestra biológica aislada de (a).

Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación

25 computerizada en el paso (c).

El término "diagnóstico", tal y como se utiliza en la presente invención, a la capacidad de discriminar entre individuos infectados o no por el parásito *T. cruzi*. También se refiere, pero sin limitarnos, a la capacidad de discriminar

30 entre muestras procedentes de pacientes que presentan diferentes estados de la enfermedad de Chagas: la fase aguda, poco después de la infección, la fase indeterminada y la fase crónica. A su vez, atendiendo al primer método de la

presente invención, 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. La cantidad que es significativamente estadística 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 de forma diferencial 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.

Una "muestra biológica aislada" incluye, 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 a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63 en una muestra biológica aislada de un individuo es indicativa de 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 y condición física. En una realización particular de la invención el individuo tiene menos de dos años de edad. En otra realización particular, el individuo es un neonato.

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

5 Un antígeno o inmunógeno es una sustancia capaz de producir una respuesta del sistema inmune adaptativo mediante la activación de linfocitos. Los antígenos son usualmente proteínas o polisacáridos. Los lípidos y ácidos nucleicos son antigénicos únicamente cuando se combinan con proteínas y polisacáridos.

10

El antígeno KMP11, o "*kinetoplastid membrane protein 11KDa*", es una proteína exclusiva de kinetoplastidos, y se expresa en todos los estadios del ciclo de vida del parásito. Se encuentra asociada tanto a membrana como al citoesqueleto y cavidad flagelar (Thomas *et al.*, 2000. *DNA. Cell Biol* 19: 47-57) y tiene una alta capacidad inmunogénica (Thomas *et al.*, 2001. *Clin Exp Immunol* 123: 465-471) e inmunoprotectora (Planelles *et al.*, 2001. *Infect Immunol* 69: 6558-6563). Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) CAA03901; y/o en la SEQ ID NO: 1).

15

En el contexto de la presente invención, KMP11 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

20

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,

25

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

30

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el

polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína KMP11.

El antígeno HSP70, o "*Heat shock protein 70KDa*", es una proteína altamente conservada en todas las especies a lo largo de toda la evolución. Se ha encontrado una fuerte respuesta humoral frente a péptidos de la proteína HSP70, en pacientes chagásicos crónicos (Requena *et al.*, 1993. *Mol Immunol* 30: 1115-1121), que sin embargo no da lugar a un reconocimiento cruzado de la proteína homóloga humana (Engman *et al.*, 1989. *Mol Biochem Parasitol* 37: 285-287). Su secuencia aminoacídica se encuentra en la SEQ ID NO: 2)

En el contexto de la presente invención, HSP70 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína HSP70.

El antígeno PFR2, o "*paraflagellar rod protein*", es una proteína muy conservada en tripanosomátidos que se localiza exclusivamente en el flagelo del parásito. Además se ha comprobado que en infección experimental (modelo murino) se generan linfocitos T CD8+ frente a esta proteína, (Wrightsmann *et al.*, 2002. *Parasite Immunol* 24: 401-412), y que la inmunización con vacunas ADN

codificando PFR2 es protectora (Morell *et al.*, 2006. *Vaccine* 24: 7046-7055).

En el contexto de la presente invención, PFR2 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia
5 codificante de la proteína que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) AAA30221 y/o en la SEQ ID NO: 3, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 3,
- 10 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que
15 comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 3, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína PFR2.

20 La proteína TGP63 es un fragmento de la proteína GP63 o "*leishmanolysin*", descrita en *Leishmania infantum*. Este fragmento participa en la unión del parásito con el macrófago (Olivier *et al.*, 2005. *Clin Microbiol Rev* 18: 293- 305). Se ha descrito el reconocimiento de dicha proteína por sueros de pacientes de leishmaniasis cutánea (Jensen *et al.*, 1996. *Am J Trop Med Hyg* 55: 490-495).
25 Su secuencia aminoacídica se encuentra en la SEQ ID NO: 4)

.En el contexto de la presente invención, TGP63 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia
30 codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 4, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 4,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

5 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 4, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína TGP63.

10

La detección de los anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. Los autores de la presente invención han demostrado que la detección de la cantidad o la concentración de estos anticuerpos de manera semi-cuantitativa o cuantitativa permiten diferenciar entre los diferentes estadios de la enfermedad. De esta manera, se puede establecer un diagnóstico diferencial en individuos afectados por la enfermedad de Chagas, que permite subclasificarlos.

15

20 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).

25

30

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los anticuerpos, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de los anticuerpos obtenidos mediante medida directa. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

10

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 a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 de una o varias muestras de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (c) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

20

El término “cantidad de referencia”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad absoluta o relativa de anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 que permite discriminar un determinado estadio de la enfermedad de Chagas de otros estadios. 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

30

diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas crónica cardíaca avanzada, la cantidad de referencia sería la cantidad de los anticuerpos anti-HSP70, anti-PFR2 y/o anti-TGP63 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 (anti-KMP11, anti-HSP70, anti-PFR2 y/o anti-TGP63) detectados en una muestra biológica del mismo individuo obtenida con anterioridad. La cantidad de referencia puede ser obtenida también, pero sin limitarnos, a partir de los valores detectados en la madre, particularmente en el caso del diagnóstico o seguimiento de individuos menores de dos años de edad.

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.

El término "anticuerpo" tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunoreacciona) con las proteínas (antígenos) KMP11, HSP70, PFR2 o TGP63. Hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Anticuerpos que reconocen a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63 o a determinados fragmentos de las mismas se describen en los ejemplos de la presente memoria. Los anticuerpos que reconocen las proteínas KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63 pueden ser empleados para llevar a cabo los métodos de la presente invención, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante *immunoblot*,

ELISA o inmunohistoquímica. En una realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA.

5 El término "anticuerpo frente al antígeno KMP11" se refiere a un anticuerpo capaz de reaccionar con la proteína KMP11, con una variante de la proteína KMP11 o con un fragmento de la misma, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término anticuerpo frente al antígeno KMP11 se refiere a una inmunoglobulina G (IgG).

10 El término "anticuerpo frente al antígeno HSP70" se refiere a un anticuerpo capaz de reaccionar con la proteína HSP70, con una variante de la proteína HSP70 o con un fragmento de la misma, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término anticuerpo frente al antígeno HSP70 se refiere a una inmunoglobulina G (IgG).

15 El término "anticuerpo frente al antígeno PFR2" se refiere a un anticuerpo capaz de reaccionar con la proteína PFR2, con una variante de la proteína PFR2 o con un fragmento de la misma, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término autoanticuerpo frente al antígeno PFR2 se refiere a una inmunoglobulina G (IgG).

20

El término "anticuerpo frente al antígeno TGP63" se refiere a un anticuerpo capaz de reaccionar con la proteína TGP63, con una variante de la proteína TGP63 o con un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término autoanticuerpo frente al antígeno TGP63 se refiere a una inmunoglobulina G (IgG).

25

30 En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a cualquiera de las proteínas KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63. En general, una variante incluye adiciones, deleciones

o sustituciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

5 Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga" a cualquiera de las proteínas KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63, cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 respectivamente; es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado
10 de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 respectivamente de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%. Las secuencias
15 homologas a cualquiera de las proteínas KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63 pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

La expresión "funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa
20 que las proteínas o el/los fragmento/s de la/s proteína/s en cuestión mantiene/n esencialmente las propiedades biológicas o inmunológicas descritas en este documento. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales tales como los descritos en los ejemplos que acompañan a esta descripción.

25 En otra realización preferida, la detección de la cantidad de los anticuerpos frente a al menos dos, preferiblemente tres, y aún más preferiblemente los cuatro antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63 se realiza mediante un inmunoensayo. El término "inmunoensayo", tal y como se utiliza en la presente
30 descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de una anticuerpo con un antígeno.

Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o *chips* de proteína.

5

En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en
10 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.

En una realización más preferida, el ELISA es un ELISA indirecto, y más
15 preferiblemente comprende los siguientes pasos:

- (a) recubrir un soporte sólido con al menos dos, preferiblemente tres, y más preferiblemente los cuatro antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63, una variante de las proteínas KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 o un fragmento de las mismas;
- 20 (b) incubar el soporte recubierto del paso (a) con una muestra biológica obtenida del sujeto en condiciones que permitan la formación de un inmunocomplejo de los anticuerpos frente a, al menos dos, preferiblemente tres, y más preferiblemente los cuatro antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 presentes en la muestra, con al menos dos,
25 preferiblemente tres, y más preferiblemente los cuatro antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63, con sus variantes o con sus fragmentos; e
- (c) incubar con un anticuerpo secundario, que reconoce a los anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63, conjugados o unidos a un compuesto marcador.

30

En todos los casos los antígenos se fijan sobre el soporte sólido en pocillos diferentes, y/o de manera que puedan identificarse los anticuerpos específicos frente a cada uno de los antígenos de forma independiente.

5 En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, el individuo del que obtiene la muestra biológica aislada del paso (a) es menor de dos años de edad. En otra realización más preferida, el individuo del que obtiene la muestra biológica aislada del paso (a) es un neonato o lactante y la madre es seropositiva.

10 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, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad de anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63. El compuesto marcador se selecciona de la
15 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
20 fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ^{32}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

25 Los autores de la presente invención han visto que el nivel de reconocimiento de los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 por los paciente chagásicos es muy superior comparado con los individuos sanos, con diferencias estadísticamente significativas (Fig. 2). Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico de la enfermedad de Chagas, de ahora
30 en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) – (c) del primer método de la invención, y además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas,

cuando presenta una cantidad de anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 detectados en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa a la cantidad de referencia de (c), siendo la cantidad de referencia uno o varios controles negativos.

5

En una realización preferida, la detección de la cantidad de anticuerpos frente a, al menos dos, preferiblemente tres, y más preferiblemente los cuatro antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 se realiza mediante un inmunoensayo. En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo
10 inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), y en otra realización aún más preferida, el ELISA es un ELISA indirecto.

Los inventores han demostrado que, cuando se separan los pacientes
15 chagásicos según el estadio de la enfermedad, tanto los pacientes con Chagas indeterminado como con patología cardíaca o digestiva mostraron un reconocimiento significativamente superior de KMP11, HSP70 y PFR2 que los controles negativos (Fig 3 A, B y C). Por tanto, otro aspecto de la invención, se refiere a un método de diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas, de
20 ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende los pasos (a) – (c), y además comprende asignar a un individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas indeterminada o con patología cardíaca o digestiva, cuando presenta una cantidad de anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70 y/o PFR2 detectados en el paso (b) mayor y
25 estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia, siendo la cantidad de referencia uno o varios controles negativos.

El reconocimiento de la proteína TGP63 permite diferenciar los pacientes en fase crónica con patología digestiva de los controles negativos (Fig 3D). Así, en
30 una realización más preferida de este aspecto, el tercer método de la invención además comprende asignar a un individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas crónica digestiva cuando presenta una

cantidad de anticuerpos frente al antígeno TGP63 detectados en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia, cuando la cantidad de referencia son uno o varios controles negativos.

5

En una realización más preferida de este aspecto, el tercer método de la invención además comprende asignar a un individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas crónica cardíaca avanzada cuando presenta una cantidad de anticuerpos frente a los antígenos HSP70, PFR2 y/o TGP63 detectados en el paso (b) menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia, siendo la cantidad de referencia la cantidad detectada de estos anticuerpos en pacientes con Chagas indeterminado (Tabla I).

10

| <i>Grupos</i> <i>Ag</i> | IND | CARD AVANZADA | IND/CARD AVANZADA (a) |
|----------------------------|---------------|------------------|--------------------------|
| KMP11 | 0.699 ± 0.588 | 0.447 ± 0.534 | p = 0.498 |
| HSP70 | 0.906 ± 0.556 | 0.274 ± 0.189 | p = 0.100* |
| PFR2 | 1.092 ± 0.830 | 0.311 ± 0.277 | p = 0.100* |
| TGP63 | 0.836 ± 0.750 | 0.159 ± 0.159 | p = 0.100* |
| STcA | 1.510 ± 0.794 | 0.972 ± 0.574 | p = 0.301 |

15

Tabla I. Reconocimiento de antígenos en pacientes en fase indeterminada y pacientes con patología cardíaca avanzada. Los valores se expresan como la media ± desviación estándar obtenida con sueros de pacientes en fase indeterminada (n=15) y pacientes con patología cardíaca avanzada (n=3).

20

(a) Se aplicó el método no paramétrico U de Mann Withney. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas si $p \leq 0.1$ (*).

25

La quimioterapia actual es muy eficaz en los primeros estadios de la infección, pues evita que el parásito entre en tejidos y de lugar a su cronicidad. Además, la aparición de efectos adversos correlaciona negativamente con la edad del

paciente. Es por ello, que actualmente, a los hijos de madres seropositivas frente a la enfermedad de Chagas se les realiza el diagnóstico parasitológico y serológico al nacer. Si el parasitológico da positivo (cosa muy infrecuente pues la tasa de parásitos que pasan por placenta es baja), no hay mayor problema pues se le trata inmediatamente. Sin embargo, el serológico siendo más sensible no permite normalmente diferenciar entre los anticuerpos procedentes de la madre o aquellos generados por el hijo. Así, el protocolo clínico establece mantener vigilado al hijo durante 24 meses, realizándole continuos ensayos parasitológicos y serológicos para detectar el parásito o una fuerte seroconversión que indique la presencia del mismo. El método de la presente invención permite analizar el patrón de anticuerpos de la madre *versus* el del hijo post-nacimiento y a cortos tiempos de éste e identificar si los anticuerpos presentes en el hijo son procedentes de la madre o generados por el hijo por la presencia del parásito. Este análisis permitirá adelantar significativamente el inicio del tratamiento y, por tanto, favorecer la no infección tisular por parte de los parásitos y evitar así el estableciendo de la enfermedad. Por tanto, en una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la madre del individuo del que se obtiene la muestra biológica aislada del paso (a) es seropositiva frente a Chagas.

20

En la presente invención se demuestra cómo el tratamiento con benznidazol varía la respuesta humoral de los pacientes frente al reconocimiento de estas proteínas (Fig. 4 y Fig. 5). Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método de seguimiento de la evolución de la enfermedad de Chagas en individuos chagásicos, de ahora en adelante cuarto método de la invención, que comprende:

- a) tomar una muestra biológica aislada de un individuo,
- b) detectar la cantidad de anticuerpos frente a, al menos dos, preferiblemente tres, y más preferiblemente los cuatro antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63, presentes en la muestra biológica aislada de (a),
- c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia, y

30

d) repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo según el paso (a), de manera no simultánea.

5 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. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el seguimiento se realiza post-
10 tratamiento. En otra realización preferida de este aspecto, el cuarto método de la invención además comprende asignar a un individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas indeterminada, cuando la cantidad de anticuerpos frente al antígeno TGP63, detectados en el paso (b), disminuye tras el tratamiento (Fig. 5A). En otra realización preferida de este
15 aspecto, el cuarto método de la invención además comprende asignar a un individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas crónica cardíaca, cuando la cantidad de anticuerpos frente a los antígenos HSP70 y/o PFR2, detectados en el paso (b), disminuye tras el tratamiento (Fig. 5B). En otra realización preferida de este
20 aspecto, el cuarto método de la invención además comprende asignar a un individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas crónica cardíaca avanzada, cuando la cantidad de anticuerpos frente al antígeno TGP63, detectados en el paso (b), aumenta tras el tratamiento (Fig. 5C). En otra realización preferida de este
25 aspecto, el cuarto método de la invención además comprende asignar a un individuo según el paso (a), que se encuentra en fase aguda, al grupo de individuos con fallo terapéutico cuando la cantidad de anticuerpos frente a los antígenos KMP11 y HSP70 no disminuye tras el tratamiento (Fig. 6).

En una realización preferida, la detección de la cantidad de anticuerpos frente
30 a, al menos dos, preferiblemente tres, y más preferiblemente los cuatro antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 se realiza mediante un inmunoensayo. En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo

inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), y en otra realización aún más preferida, el ELISA es un ELISA indirecto. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, el individuo del que obtiene la muestra biológica aislada del paso (a) es menor de dos años de edad. En otra realización más preferida, el individuo del que obtiene la muestra biológica aislada del paso (a) es un neonato o lactante y la madre es seropositiva para Chagas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para analizar la cantidad de anticuerpos frente a, al menos dos, preferiblemente tres, y más preferiblemente los cuatro antígenos en la muestra obtenida en el paso (a). Más preferiblemente comprende los medios necesarios para comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

Aún más preferiblemente, el kit de la presente invención comprende los elementos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la presente invención.

Dicho kit puede contener todos aquellos reactivos necesarios para analizar la cantidad de anticuerpos frente a, al menos dos, preferiblemente tres, y más preferiblemente los cuatro antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63, por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento como, por ejemplo, pero sin limitarse, a las proteínas KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63, una variante o un fragmento de las mismas purificados, anticuerpos capaces de reconocer específicamente a los anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63, o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización.

Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir 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

Fig. 1. Visualización de los antígenos purificados. Las proteínas recombinantes KMP11 (carril 1), HSP70 (carril 2), TGP63 (carril 3), PFR2 (carril 4), así como el extracto proteico STcA (carril 5) se visualizaron mediante SDS-PAGE en un gel al 12% teñido con comassie blue.

Fig. 2. Reconocimiento de los diferentes antígenos por sueros de pacientes chagásicos. Los niveles de anticuerpos IgG específicos de los diferentes antígenos se analizó mediante la técnica de ELISA como se ha descrito en Materiales y Métodos. Se representa los valores de la mediana y

cuartiles correspondientes a 22 controles negativos y 38 pacientes chagásicos sin tratamiento. Se indican los valores de p cuando las diferencias entre grupos se consideran estadísticamente significativas (si $p \leq 0.1$).

5 **Fig. 3. Reconocimiento de antígenos por pacientes chagásicos en distintas fases de la enfermedad.** Se ensayaron sueros de 22 donantes sanos (C-), 15 pacientes indeterminados (Ind), 15 pacientes con patología cardiaca (Card) y 8 pacientes con patología digestiva (Dig), previos al inicio del tratamiento, como en la figura anterior. Se indican los valores de p cuando las
10 diferencias entre grupos se consideran estadísticamente significativas (si $p \leq 0.1$).

Fig. 4. Dinámica de reconocimiento de antígenos en pacientes chagásicos tratados con benznidazol. Se midió el nivel de anticuerpos de 28 sueros de
15 pacientes chagásicos frente a distintos antígenos parasitarios antes del inicio de tratamiento (T0), 3 meses (T1), 6 meses (T2), y 9 meses (T3) post-tratamiento. Se representan las medias y desviaciones estándar. Se indican los valores de p cuando las diferencias entre grupos se consideran estadísticamente significativas (si $p \leq 0.1$).

20 **Fig. 5. Dinámica de reconocimiento de antígenos en pacientes chagásicos en distintas fases de la enfermedad.** La dinámica de reconocimiento de los diferentes antígenos se midió como anteriormente, utilizando sueros de (A) 15 pacientes en fase indeterminada, (B) 11 pacientes con patología cardiaca, (C) 3
25 pacientes con patología cardiaca avanzada y (D) 6 controles negativos. Se indican los valores de p cuando las diferencias entre grupos se consideran estadísticamente significativas (si $p \leq 0.1$).

Fig. 6. Efecto del tratamiento con benznidazol o Nifurtimox en pacientes pediátricos en fase aguda. La dinámica de reconocimiento de los antígenos
30 (A) KMP11 y (B) HSP70 se midió como anteriormente utilizando sueros de 11

pacientes en fase aguda antes (pre) y después (post) del tratamiento con benznidazol. Para calcular los valores de p se utilizó el test de Wilcoxon.

Fig. 7. Patrón de reconocimiento de antígenos en pacientes chagásicos bajo tratamiento. Se representan los pacientes agrupados según su clasificación clínica. Para cada suero chagásico se estudió la variación en el tiempo (T1, T2, T3) de la D.O. relativa al valor obtenido en T0 (inicio del tratamiento), frente a cada uno de los antígenos. Para el cálculo del ratio de reconocimiento se tuvieron en cuenta las desviaciones estándar de cada medida.

Fig. 8. Patrón de reconocimiento de antígenos en un neonato y su madre seropositiva para Chagas. La dinámica de reconocimiento de los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63 se midió como anteriormente utilizando sueros de un bebé nacido de madre seropositiva para Chagas en un periodo de tiempo comprendido entre el nacimiento (cordón), y el inicio de tratamiento con benznidazol a los 16 meses, así como 3 meses tras el inicio del tratamiento. Los resultados se comparan con la serología de su madre, desde el embarazo (cinco meses de gestación), hasta un año después del parto.

20

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 de la enfermedad de Chagas, y para el diagnóstico y el seguimiento de dicha enfermedad.

25

MATERIALES Y MÉTODOS

30

Sujetos del estudio

Pacientes chagásicos y donantes sanos procedentes de distintos países de América Latina, y residentes en España. Los individuos se clasificaron clínicamente 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 de tratamiento con benznidazol (T0), y a los 3 (T1), 6 (T2) y 9 (T3) meses posteriores al inicio del tratamiento.

Los pacientes pediátricos son residentes en Venezuela y se infectaron por vía oral. El diagnóstico se realizó menos de un mes tras el momento de la infección. Por tanto, se trata de pacientes en fase aguda.

Purificación de antígenos

Las proteínas KMP11 (Thomas *et al.*, 2000. *DNA Cell Biol* 19: 47-57), HSP70 (Maranon *et al.*, 2000. *Int Immunol* 12: 1685-1693), y PFR2 (Morell *et al.*, 2006. *Vaccine* 24: 7046-7055) se purificaron siguiendo los protocolos ya publicados. El fragmento TGP63 de *Leishmania infantum* se clonó en el plásmido pQE30 y se sobreexpresó en la cepa M15 de *E. coli* con 0.1 mM de *isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) 1.5 horas a 37°C. Tras solubilizar la proteína mediante sonicación en tampón fosfato a pH 8 (Na₂HPO₄ 50 mM, ClNa 300mM), se procedió a su purificación mediante cromatografía de afinidad con la resina Ni²⁺ NTA (Quiagen). La elución de la proteína se realizó a pH 4-5.

Para la obtención del lisado de antígenos solubles de *T. cruzi* (STcA) se utilizaron mezclas de amastigotes y tripomastigotes (1:1) obtenidos tras infección de monocapas de células LLC-MK2. Los parásitos se lavaron con PBS 1x, y el pellet se resuspendió en NET-2 (50 mM Tris HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 0,05% Nonidet P-40, 1 µg/ml leupeptina, 1mM PMSF). Tras sonicación, se centrifugó 20 minutos a 10,000 rpm y 4°C y se recogió el sobrenadante. Las distintas fracciones se chequearon en geles desnaturalizantes SDS-page al 12

% (Fig 1). La pureza de las proteínas recombinantes siempre fue superior al 90%. Los distintos antígenos se agruparon en lotes homogéneos, que se alicuotearon a -20°C hasta su uso.

5 **ELISA:** (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

Los niveles de anticuerpos IgG específicos frente a las distintas proteínas empleadas, se determinaron en sueros chagásicos y sueros normales siguiendo los protocolos descritos en (Thomas *et al.*,2001. *Clin Exp Immunol* 10 123: 465-471). Los sueros se ensayaron en triplicado y en dos diluciones. En cada ensayo se incluyeron los correspondientes controles positivos y negativos, y se desecharon aquellos ensayos en los que las densidades ópticas de los controles fueron más de un 20% diferentes a los valores esperados. El análisis se realizó con los sueros diluidos 1/1600 para HSP70, 15 PRF2 y TGP63, 1/3200 para KMP11 y 1/12800 para STcA.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa SPSS 15.0. Las diferencias estadísticamente 20 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 consideró que las diferencias son estadísticamente significativas si el intervalo de confianza fue de al menos un 90% ($p \leq 0.1$)

25

RESULTADOS

Reconocimiento de KMP11, HSP70, PFR2, TGP63 y STcA en sueros de pacientes chagásicos.

30

En el presente resumen se muestran los resultados obtenidos para un total de 60 sueros de individuos no tratados: 22 donantes sanos, 15 pacientes

chagásicos en fase indeterminada, 15 pacientes crónicos con patología cardíaca y 8 pacientes con patologías digestivas. Se midió el nivel de anticuerpos IgG, mediante la técnica ELISA, frente a las proteínas KMP11, HSP70, PFR2, TGP63, STcA. El nivel de reconocimiento de dichas proteínas por los paciente chagásicos fue muy superior comparado con los donantes sanos, con diferencias estadísticamente significativas (Fig 2). Cuando se separaron los pacientes chagásicos según el estadio de la enfermedad, se encontró que tanto los pacientes con chagas indeterminado como con patología cardíaca o digestiva mostraron un reconocimiento significativamente superior de KMP11, HSP70, PFR2 y STcA que los controles negativos (Fig 3 A, B, C y E). Los donantes sanos mostraron un reconocimiento muy variable de la proteína TGP63, y por ello sólo los sueros de pacientes en fase crónica con patología digestiva reconocieron de forma estadísticamente significativa dicha proteína en comparación con los controles negativos (Fig. 3D). Tal como se muestra en la Tabla I, los sueros de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica cardíaca avanzada presenta una cantidad de anticuerpos frente a los antígenos HSP70, PFR2 y/o TGP63 menor y estadísticamente significativa en comparación con la cantidad detectada de estos anticuerpos en pacientes con Chagas indeterminado.

20

Modificaciones del perfil de anticuerpos tras el tratamiento con benznidazol

26 pacientes chagásicos (15 en fase indeterminada y 11 con patología de tipo cardíaco) fueron tratados con benznidazol durante 60 días, y se realizaron recogidas de muestra de suero a diferentes tiempos post-tratamiento, para estudiar el efecto del benznidazol en la respuesta humoral. Mediante la técnica de ELISA, se midió el nivel de anticuerpos de tipo IgG, frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2, TGP63 y STcA.

30

Como se puede ver en la Fig 4, no se observaron diferencias significativas del reconocimiento de los antígenos totales del parásito (STcA), así como de y

TGP63 cuando se analizaron todos los pacientes chagásicos independientemente del estadio de la enfermedad. Sin embargo, se observaron disminuciones significativas del reconocimiento de los antígenos a partir de 6 meses para KMP11 y HSP70 y a los tres meses para PFR2.

5

Cuando se analizaron los pacientes chagásicos por estadio de la enfermedad, pudo observarse que la disminución significativa del reconocimiento de las proteínas KMP11, HSP70 y PFR2 se sigue observando en el caso de los sueros de pacientes en fase crónica con patología cardíaca (cardíacos) (Fig 5B).

10 En pacientes en fase indeterminada la tendencia a la disminución del reconocimiento de KMP11 se mantiene, pero no se observaron disminuciones significativas de los niveles de anticuerpos IgG específicos de HSP70 y PFR2 (Fig 5A). Sin embargo, en este último grupo se observó una disminución transitoria del reconocimiento de la proteína TGP63 después de 3 meses de
15 tratamiento. En ningún caso se encontraron variaciones significativas de los niveles de anticuerpos frente a STcA (Fig. 5 A y B). Tal y como se muestra en la Fig. 5C, en los individuos con enfermedad de Chagas crónica cardíaca avanzada se observó un aumento, estadísticamente significativo, de la cantidad de anticuerpos frente al antígeno TGP63 tras el tratamiento.

20

Para excluir que las diferencias encontradas no se debieran a las fluctuaciones normales de los niveles de anticuerpos circulantes, se estudió la evolución de la respuesta inmunológica en individuos sanos; para ello se recogieron muestras de 6 donantes sanos a, al menos 12 meses de intervalo (T0 y T4), y
25 se ensayaron frente a KMP11, HSP70, PFR2, TGP63 y STcA. Se observó que no existían diferencias significativas entre las dos muestras (Fig 5D). Por tanto las diferencias en la respuesta inmunológica observadas se deberían al tratamiento con benznidazol.

30 Asimismo, se analizó el reconocimiento de las proteínas HSP70 y KMP11 por sueros de 11 pacientes chagásicos pediátricos en fase aguda, infectados por vía oral. Las muestras se obtuvieron en un periodo menor a un mes tras la

infección. El efecto del tratamiento con benznidazol o nifurtimox se evaluó 70 días tras finalizar el tratamiento. Los resultados obtenidos muestran un significativo descenso en el nivel de anticuerpos frente al antígeno KMP11 (Fig 6A). De forma interesante, el único paciente en el que no se observó
5 disminución, sino al contrario, aumento, del reconocimiento de KMP11 (paciente 868) presentó un nuevo episodio agudo de Chagas, con presencia de parásitos en sangre, evidenciándose un claro fallo terapéutico. El reconocimiento de la proteína HSP70 también mostró una tendencia a la disminución. Aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa (Fig
10 6B), sí lo fue cuando los datos se analizaron excluyendo al mencionado paciente 868, con fallo terapéutico ($p=0.028$ vs $p=0.131$ para HSP70 y $p=0.005$ vs $p=0.041$ para KMP11). En ambos supuestos, dicha seroconversión no fue estadísticamente significativa frente a antígenos totales del parásito (formas epimastigotas).

15

Patrones individuales de reconocimiento específico

Con el objetivo de estudiar el patrón individual de reconocimiento de cada uno de los pacientes chagásicos se realizó el gráfico mostrado en la Fig 7, en la
20 que se reflejan las modificaciones del reconocimiento de los distintos antígenos después del tratamiento. En este estudio, además de los pacientes citados anteriormente, también se incluyeron 2 pacientes con patología digestiva. Como puede observarse, existen patrones de reconocimiento muy conservados, como son la estabilidad o disminución del reconocimiento de
25 KMP11, HSP70 y PFR2 por los sueros de los pacientes en fase indeterminada y crónica con patología cardíaca, y la estabilidad o aumento del reconocimiento de TGP63 en los pacientes en fase crónica con patología cardíaca. Sin embargo, se observaron pacientes con un patrón anómalo de reconocimiento, como el paciente en fase asintomática 1-0008, que presentó un patrón de
30 reconocimiento similar a los pacientes con patología cardíaca. La progresión de la patología del paciente 1-0008 está actualmente en análisis. Cuando se analizaron los pacientes con afectación cardíaca, se encontraron varios con un

patrón similar a aquéllos en fase indeterminada, y otros claramente diferentes, en los que no se observó disminución del reconocimiento de KMP11 y HSP70, pero sí de TGP63. Estos últimos pacientes se encontraban en fases más avanzadas de la enfermedad. Aunque sólo se analizaron muestras de dos
5 pacientes con patología digestiva, el patrón de reconocimiento de antígenos fue muy característico, con un claro aumento del reconocimiento de KMP11, algo que sólo se había observado en el paciente 3-0161, clasificado como cardiaco, pero en el que posteriormente se comprobó que también sufría de afectaciones del aparato digestivo.

10

Todos los hijos de madres chagásicas son seropositivos al nacimiento, y los títulos de anticuerpos frente a antígenos totales van disminuyendo durante el primer año muy lentamente, lo que dificulta un diagnóstico correcto. El estudio diferencial de patrones de reconocimiento de estos antígenos podría permitir un
15 diagnóstico rápido de casos de Chagas congénito. Para confirmar esta hipótesis se estudió el reconocimiento de los diferentes antígenos por parte de un caso de transmisión vertical de Chagas que fue diagnosticado y tratado a los 16 meses de edad. Como se observa en la Fig 8, tras el nacimiento puede medirse una disminución del reconocimiento serológico de los antígenos
20 KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63 por parte del neonato. Después de un descenso inicial generalizado debido a la pérdida de los anticuerpos procedentes de la madre, se observa un aumento del reconocimiento de los antígenos KMP11 y HSP70. Este aumento no puede justificarse por una transferencia pasiva durante la lactancia, dado que el reconocimiento de dichos
25 antígenos por parte de la madre se encuentra en descenso. De igual modo se observa un patrón de reconocimiento discordante para TGP63, que desciende bruscamente en la madre, mientras se conserva en el neonato. Estos datos evidencian la producción activa de anticuerpos por parte del bebé debida a una exposición post-natal al parásito. Estos estudios de reconocimiento diferencial
30 podrían acortar sensiblemente el tiempo de diagnóstico y poder iniciar el tratamiento precozmente, para evitar así el establecimiento de la enfermedad.

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas, que comprende:
 - 5 a. obtener una muestra biológica aislada de un individuo,
 - b. detectar la cantidad de anticuerpos frente a, al menos dos de los antígenos que se seleccionan de la lista que comprende KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63, en la muestra biológica aislada de (a);
y
 - 10 c. comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.

2. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas según la reivindicación anterior, donde el paso (b)
15 comprende detectar la cantidad de anticuerpos frente a, al menos tres de los antígenos que se seleccionan de la lista que comprende KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63, en la muestra biológica aislada de (a).

3. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde
20 el paso (b) comprende detectar la cantidad de los anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63, en la muestra biológica aislada de (a).

- 25 4. Método de diagnóstico de la enfermedad de Chagas que comprende los pasos (a) – (c) según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y que además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas, cuando presenta una cantidad de anticuerpos frente a, al menos dos de los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63
30 detectados en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia, siendo la cantidad de referencia uno o varios controles negativos.

5. Método de diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas que comprende los pasos (a) – (c) según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y que además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas indeterminada o con patología cardiaca o digestiva, cuando presenta una cantidad de anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70 y/o PFR2 detectados en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia, siendo la cantidad de referencia uno o varios controles negativos.
6. Método de diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas según la reivindicación anterior, que además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas crónica digestiva cuando presenta una cantidad de anticuerpos frente al antígeno TGP63 detectados en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia, cuando la cantidad de referencia son uno o varios controles negativos.
7. Método de diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas según la reivindicación 5-6, y que además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas crónica cardiaca avanzada cuando presenta una cantidad de anticuerpos frente a los antígenos HSP70, PFR2 y/o TGP63 detectados en el paso (b) menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia, siendo la cantidad de referencia la cantidad detectada de estos anticuerpos en pacientes con enfermedad de Chagas indeterminada.
8. Método de seguimiento de la evolución de la enfermedad de Chagas en individuos chagásicos, que comprende realizar al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en muestras obtenidas de un mismo individuo de manera no simultánea.

9. Método de seguimiento de la evolución de la enfermedad de Chagas en individuos chagásicos según la reivindicación anterior, donde el seguimiento se realiza post-tratamiento.
- 5 10. Método de seguimiento de la evolución de la enfermedad de Chagas según la reivindicación anterior, que además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas indeterminada, cuando la cantidad de anticuerpos frente al antígeno TGP63 detectados en el paso (b) disminuye tras el tratamiento.
- 10 11. Método de seguimiento de la evolución de la enfermedad de Chagas según la reivindicación 9, que además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas crónica cardíaca, cuando la cantidad de anticuerpos frente a los antígenos HSP70 y/o PFR2 detectados en el paso (b) disminuye tras el tratamiento.
- 15 12. Método de seguimiento de la evolución de la enfermedad de Chagas según la reivindicación 9, que además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de Chagas crónica cardíaca avanzada, cuando la cantidad de anticuerpos frente al antígeno TGP63 detectados en el paso (b) aumenta tras el tratamiento.
- 20 13. Método de seguimiento de la evolución de la enfermedad de Chagas en individuos chagásicos según la reivindicación 9, que además comprende asignar al individuo según el paso (a), que se encuentra en fase aguda, al grupo de individuos con fallo terapéutico cuando la cantidad de anticuerpos frente a los antígenos KMP11 y HSP70 detectados en el paso (b) no disminuye tras el tratamiento.
- 25 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1- 13, donde el individuo del que obtiene la muestra biológica aislada del paso (a) es menor de dos años de edad.
- 30

15. Método según la reivindicación anterior, donde el individuo del que obtiene la muestra biológica aislada del paso (a) es un neonato o lactante y la madre es seropositiva para Chagas.
- 5 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1- 15, donde la detección de la cantidad de anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 del paso (b), en la muestra biológica de (a), se realiza mediante un inmunoensayo.
- 10 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1- 16, donde la detección de la cantidad de anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 del paso (b), en la muestra biológica de (a), se realiza mediante un ELISA.
- 15 18. Método según la reivindicación 17, donde el ELISA es un ELISA indirecto.
19. kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para analizar la cantidad de al menos dos de los anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2 y/o TGP63 en una muestra biológica aislada.
- 20 20. Kit según la reivindicación anterior que comprende los medios necesarios para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-18.

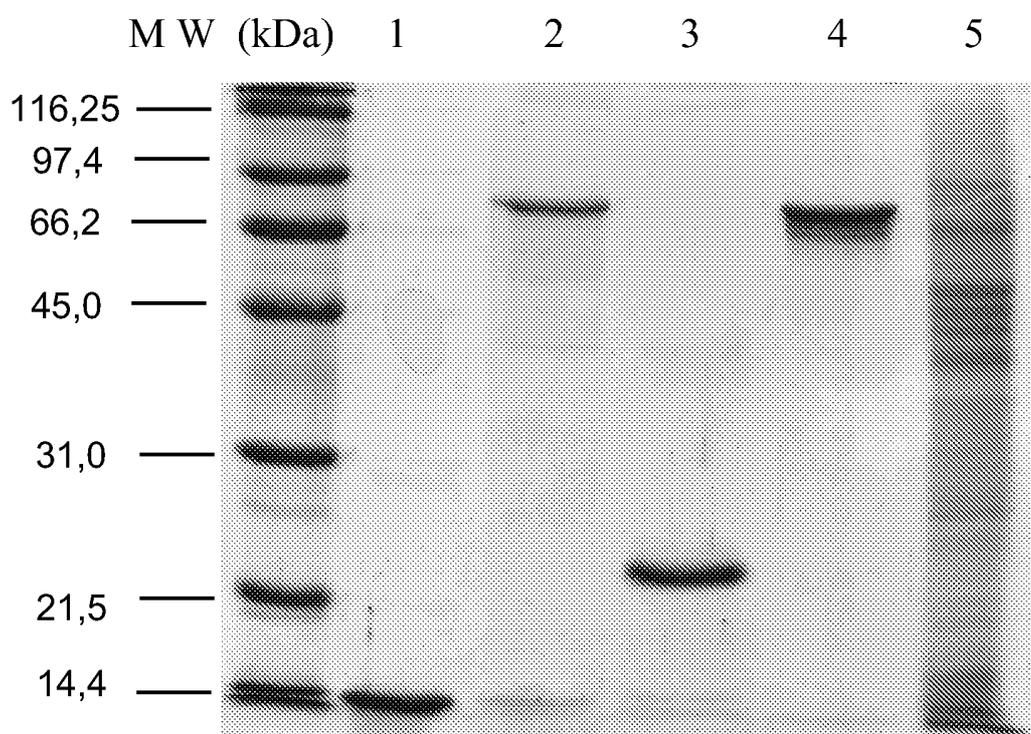


FIG. 1

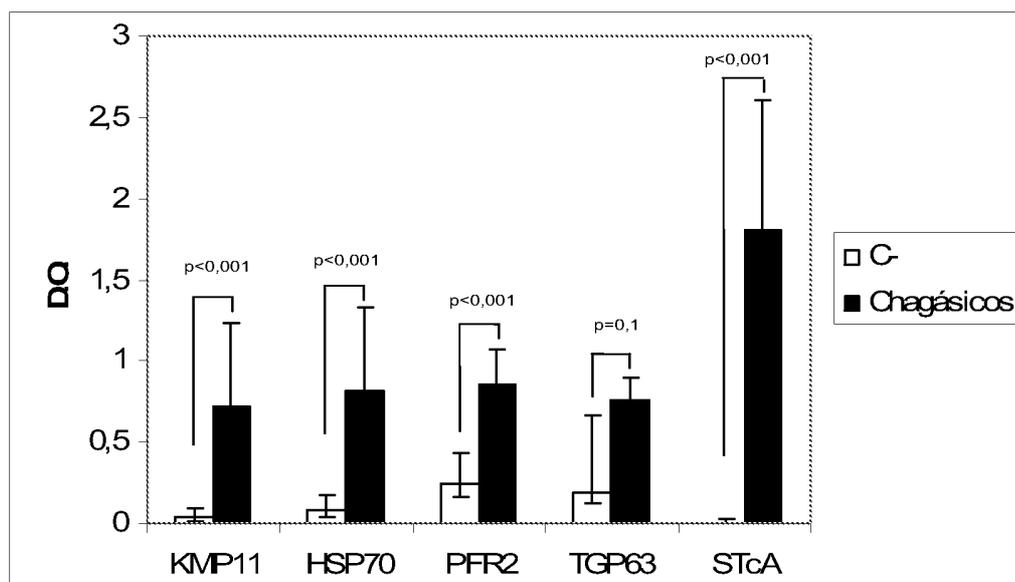


FIG. 2

KMP11

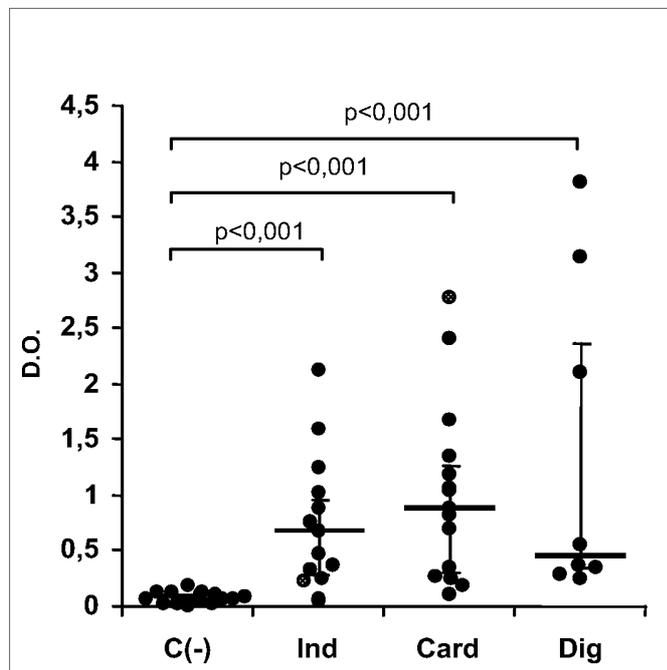


FIG. 3A

HSP70

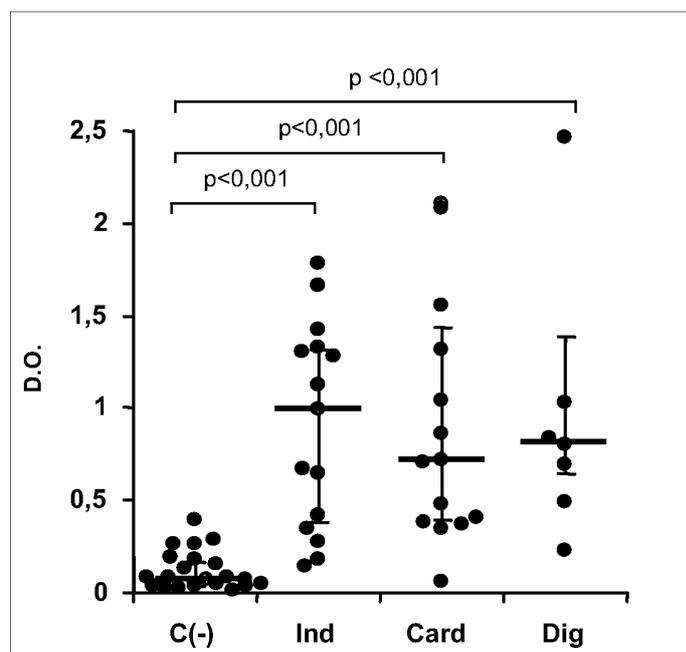


FIG. 3B

PFR2

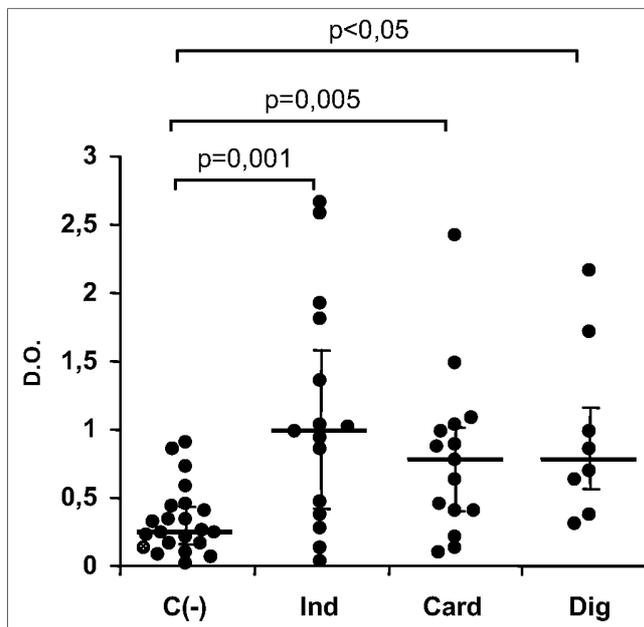


FIG. 3C

TGP63

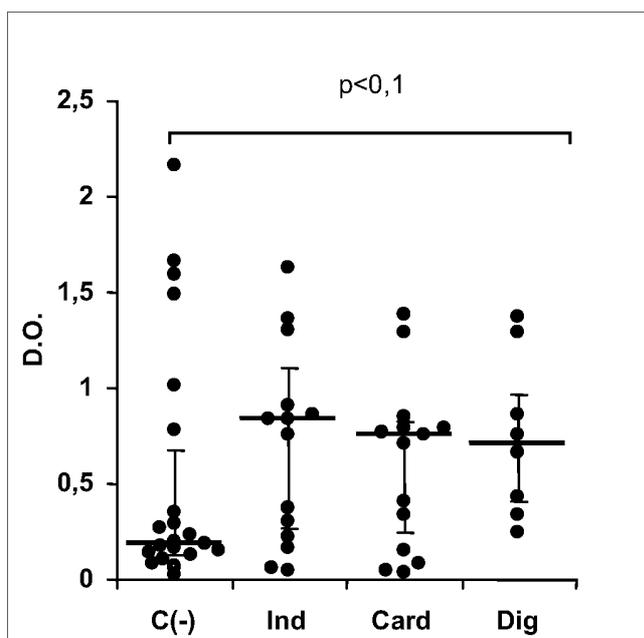


FIG. 3D

TGP63

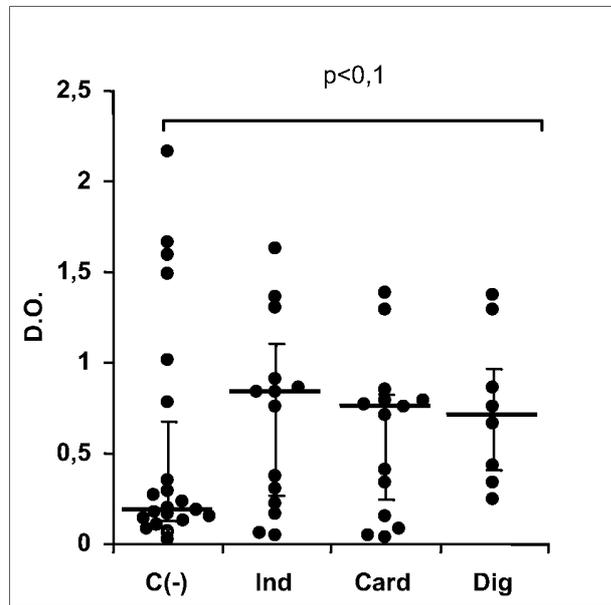


FIG. 3D

CHAGÁSICOS

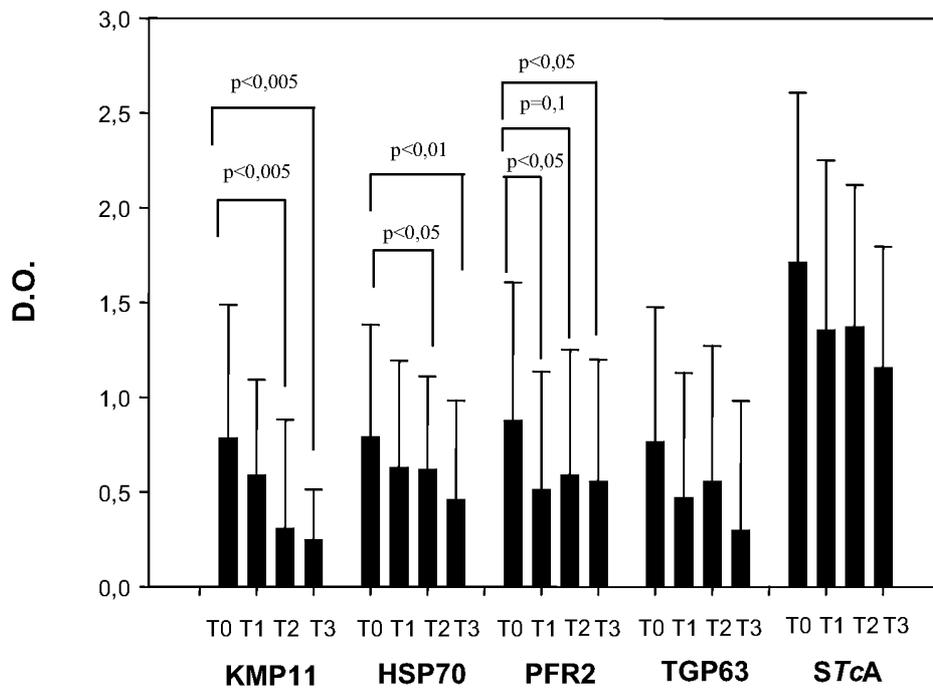


FIG. 4

INDETERMINADOS

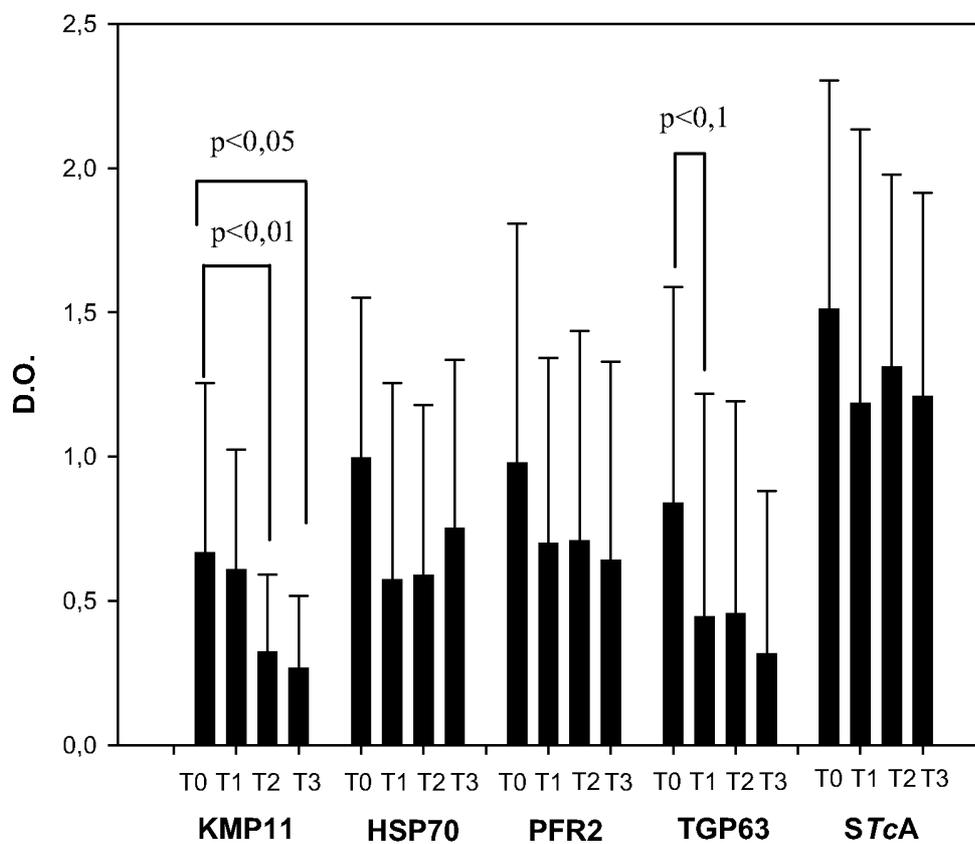


FIG. 5A

CARDIACOS

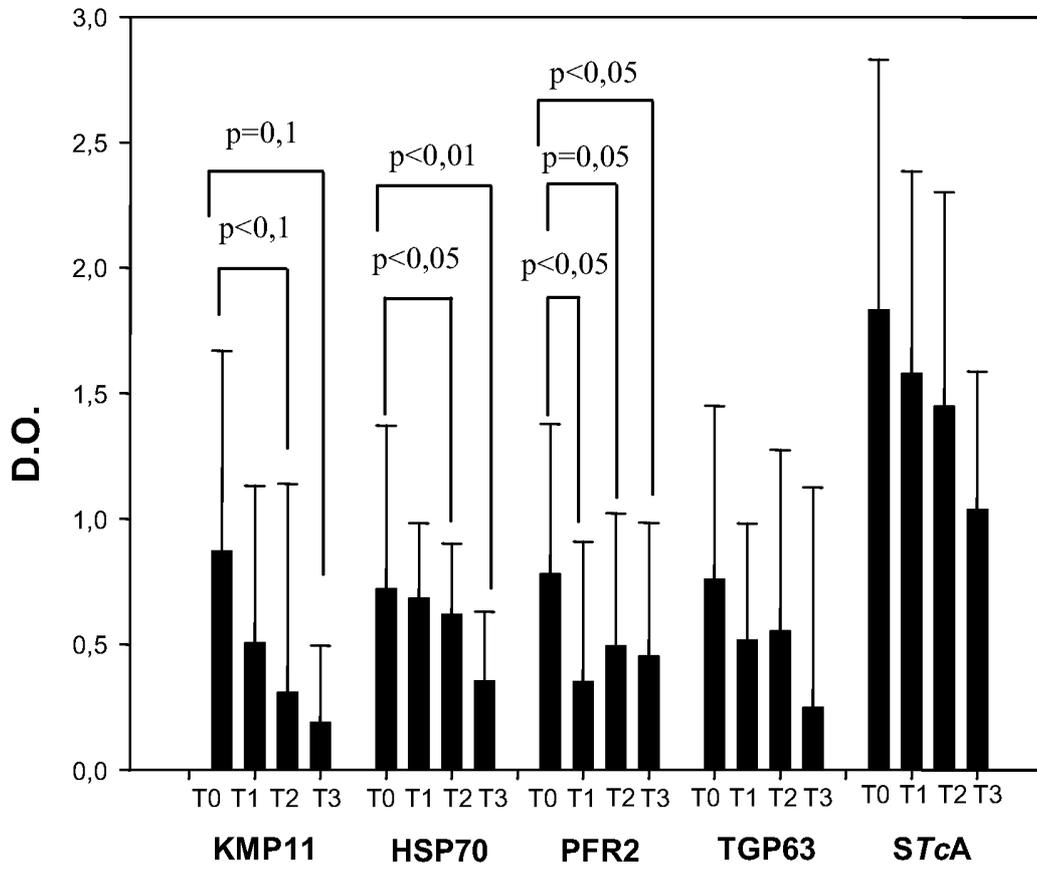


FIG. 5B

CARDIOPATÍA AVANZADA

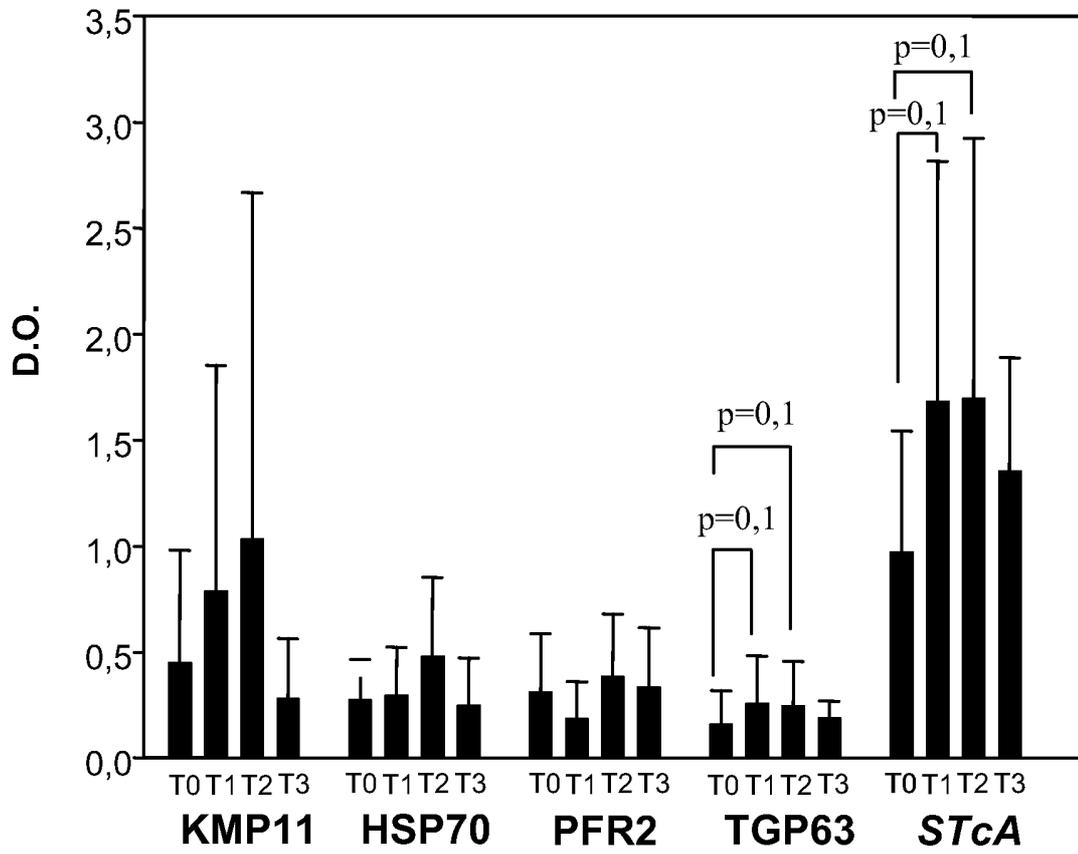


FIG. 5C

DONANTES SANOS

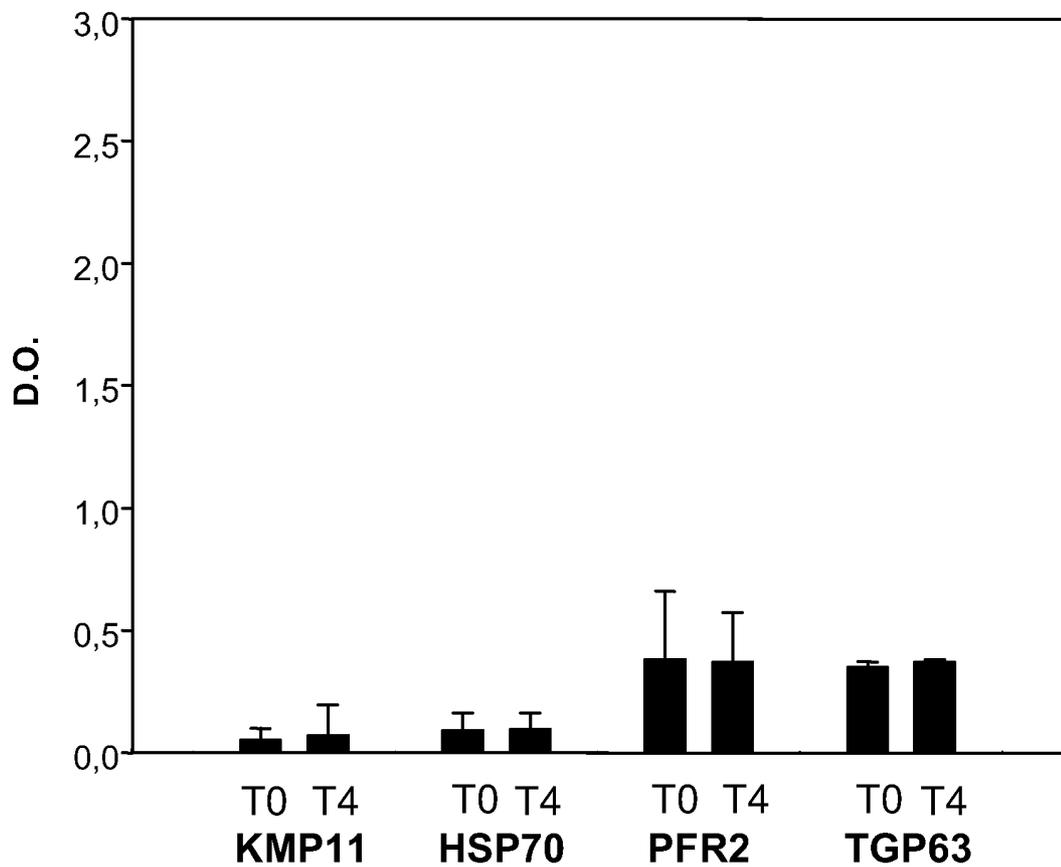
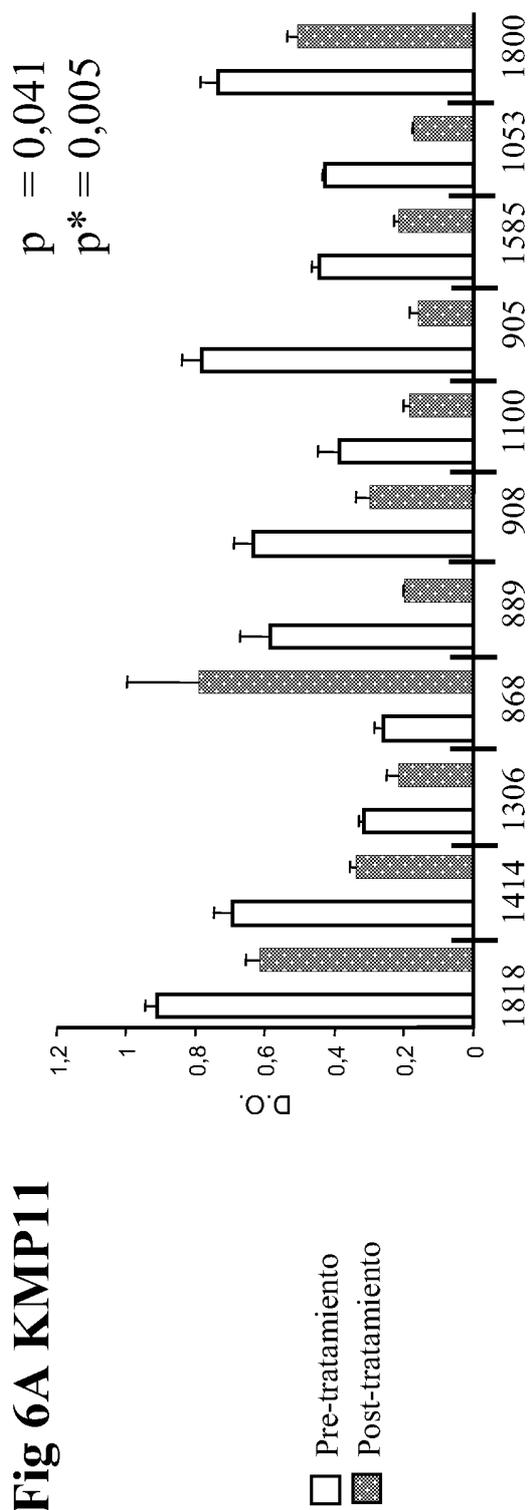


FIG. 5D



* Estudio estadístico realizado excluyendo al paciente 868

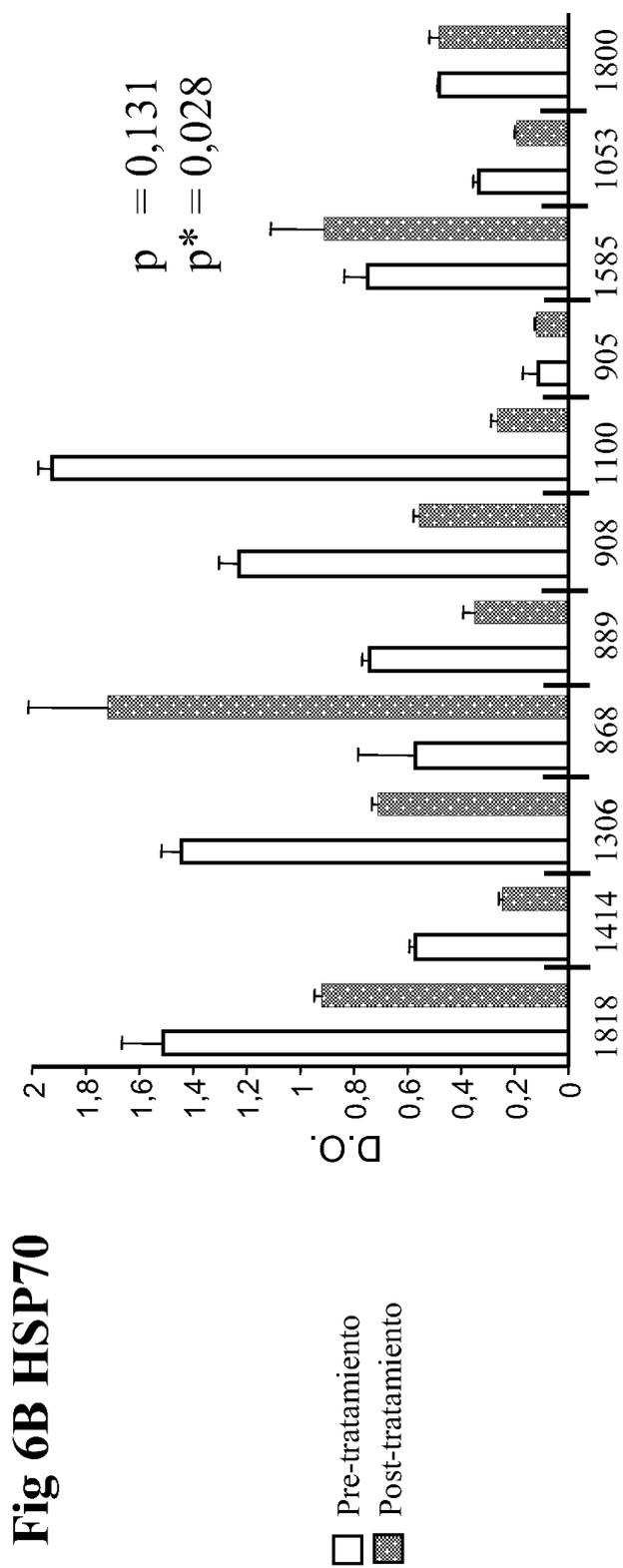


Fig 6B HSP70

* Estudio estadístico realizado excluyendo al paciente 868

Fig 8A

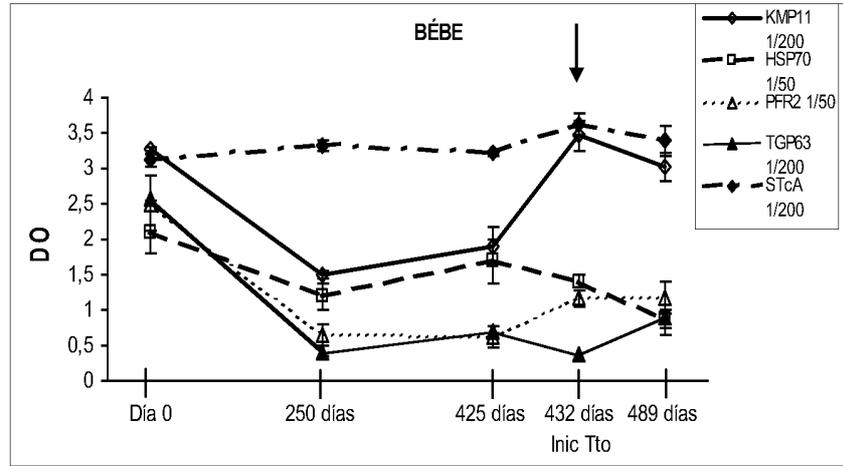
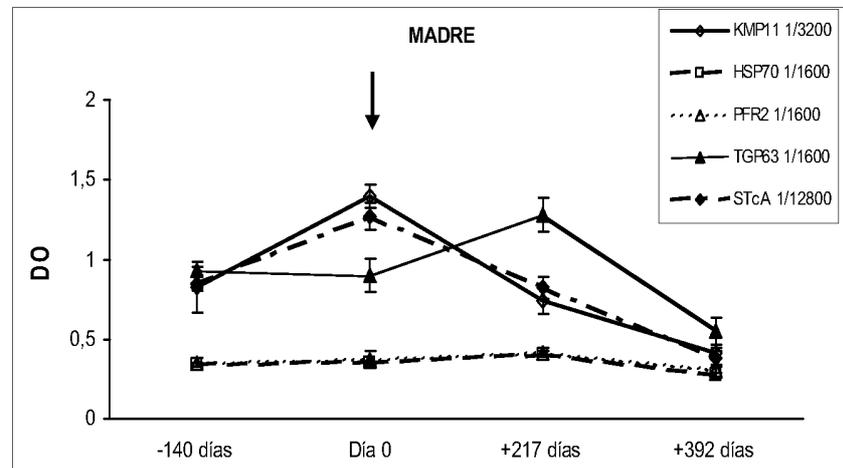


Fig 8B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 2010/070376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/569 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PUBMED, GOOGLE SCHOLAR, GENBANK, TriTrypDB (GeneDB)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| P, X | FLECHAS ID et al. Characterising the KMP-11 and HSP-70 recombinant antigens' humoral immune response profile in chagasic patients. BMC Infectious Diseases. 25-11-2009. Retrieved from Internet the 04-10-2010: <URL: http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/186 >, the whole document. | 1,4,16-18 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

“E” earlier document but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 October 2010 (04.10.2010)

Date of mailing of the international search report

(07/10/2007)

Name and mailing address of the ISA/

O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M^a D. García Grávalos

Telephone No. +34 91 349 34 04

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/070376

| C (continuation). | | | DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|-------------------|---|-----------------------|-------------------------------------|--|--|
| Category* | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | |
| X | WO 2009017736 A1 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION INC. [US]) 05-02-2009, abstract; page 7, line 24-page 9, line 10; page 14, line 24-page 15, line 3; page 15, lines 19-28; page 20, lines 6-12; page 54, line 32-page 56, line 2; page 56, lines 3-10; page 63, line 23-page 64, line 11; page 71, tab the 4; page 72, lines 6-28; claims 24-27. | 1,4,8,9,14-18 | | | |
| Y | | 2 | | | |
| Y | PASSOS et al. Recombinant Leishmania Antigens for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. October 2005, pages 1164-1167, the whole document. | 2 | | | |
| A | WO 2007056114 A2 (INBIOS INTERNATIONAL, INC. [US]) 18-05-2007, abstract; page 3, line 12-page 4, line 13; page 14, line 11-page 16-line13; claims 11-13. | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/070376

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 19, 20
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES 2010/070376

| Patent document cited in the search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2009017736 A | 05.02.2009 | CA 2700000 A | 05.02.2009 |
| | | EP 2182979 A | 12.05.2010 |
| WO 2007056114 AB | 18.05.2007 | CA 2628315 A | 18.05.2007 |
| | | AU 2006311873 A | 18.05.2007 |
| | | EP 1945248 A | 23.07.2008 |
| | | US 7695925 B | 13.04.2010 |

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES 2010/070376

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/569 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PUBMED, GOOGLE SCHOLAR, GENBANK, TriTrypDB (GeneDB)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones N° |
|------------|---|--|
| P, X | FLECHAS ID et al. Characterising the KMP-11 and HSP-70 recombinant antigens' humoral immune response profile in chagasic patients. BMC Infectious Diseases. 25-11-2009. Recuperado de Internet el 04-10-2010: <URL: http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/186 >, todo el documento. | 1,4,16-18 |

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

| | | |
|--|-----|--|
| * Categorías especiales de documentos citados: | "T" | documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. | "X" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. | "Y" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" | documento que forma parte de la misma familia de patentes. |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. | | |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada. | | |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

04 Octubre 2010 (04.10.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

07 OCTUBRE 2010 (07/10/2007)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M^a D. García Grávalos

N° de teléfono +34 91 349 34 04

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2010/070376

| C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES | | |
|--|--|--|
| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones N° |
| X | WO 2009017736 A1 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION INC. [US]) 05-02-2009, resumen; página 7, línea 24-página 9, línea 10; página 14, línea 24-página 15, línea 3; página 15, líneas 19-28; página 20, líneas 6-12; página 54, línea 32-página 56, línea 2; página 56, líneas 3-10; página 63, línea 23-página 64, línea 11; | 1,4,8,9,14-18 |
| Y | página 71, tabla 4; página 72, líneas 6-28; reivindicaciones 24-27. | 2 |
| Y | PASSOS et al. Recombinant Leishmania Antigens for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. October 2005, páginas 1164-1167, todo el documento. | 2 |
| A | WO 2007056114 A2 (INBIOS INTERNATIONAL, INC. [US]) 18-05-2007, resumen; página 3, línea 12-página 4, línea 13; página 14, línea 11-página 16-línea13; reivindicaciones 11-13. | |

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2010/070376

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones N°s: 19, 20
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
se refieren a kits que contienen antígenos para la detección de anticuerpos específicos de la enfermedad de Chagas, pero que no se especifican en las reivindicaciones indicadas. Un kit es un producto del que se deben especificar sus componentes, incluso cuando se encuentren en la descripción o ejemplos.

3. Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
Esta Administración ha identificado 11 invenciones o grupos de invenciones (Ver hoja adicional)

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:

4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

Recuadro III (continuación).- Observaciones sobre la falta unidad de invención.

La presente solicitud tiene como objeto un método de diagnóstico de la enfermedad de Chagas basado en la determinación de la respuesta humoral diferencial frente a cuatro antígenos de *Trypanosoma cruzi*: KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63, todos ellos polipéptidos conocidos en el estado de la técnica anterior. Según lo anterior, cada uso particular de estos antígenos de forma independiente o combinada como marcadores en métodos de diagnóstico constituye en sí mismo una invención. Por tanto, La solicitud de patente no satisface la exigencia de unidad de invención, puesto que no está relacionada con una sola invención o un grupo de invenciones vinculadas entre sí de tal manera que formen un solo concepto inventivo general según la regla 13.1 del PCT.

En consecuencia, esta Administración de búsqueda ha identificado 11 invenciones o grupos de invenciones. Todas ellas tienen por objeto métodos "in vitro" de detección de la infección por *T. cruzi* en adultos o menores de dos años. Comprenden además el diagnóstico diferencial de distintos estadios de la enfermedad de Chagas y/o la evaluación de la respuesta del enfermo a un tratamiento. Los métodos se basan en la detección de anticuerpos contra distintas combinaciones de antígenos y en la comparación de las cantidades detectadas con cantidades de referencia.

Las distintas invenciones, las reivindicaciones en las que quedan definidas y las combinaciones particulares de antígenos que comprende cada una de ellas se dan a continuación:

Invención 1: reivindicaciones 1, 4, 5, 7-9, 11, 14-18, todas parcialmente y 13 completa. Comprende el uso de los antígenos KMP11 y HSP70.

Invención 2: reivindicaciones 1, 4, 5, 7-9, 11, 14-18, todas parcialmente. Comprende el uso de KMP11 y PFR2.

Invención 3: reivindicaciones 1, 4, 5, 7-9, 14-18, todas parcialmente y 6, 10, 12 completas. Comprende el uso de KMP11 y TGP63.

Invención 4: reivindicaciones 1, 4, 5, 7-9, 14-18, todas parcialmente y 11 completa. Comprende el uso de HSP70 y PFR2.

Invenciones 5, 6: reivindicaciones 1, 4, 5, 7-9, 11, 14-18, todas parcialmente y 6, 10, 12 completas. Comprenden el uso de las parejas de antígenos HSP70 y TGP63 (invención 5) y PFR2 y TGP63 (invención 6).

Invención 7: reivindicaciones 1, 2, 4, 7-9, 14-18, todas parcialmente y 5, 11, 13 completas. Basada en el uso del trío de antígenos KMP11, HSP70 y PFR2.

Invención 8: reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 7-9, 11, 14-18, todas parcialmente y 6, 10, 12, 13 completas. Comprende el uso de KMP11, HSP70 y TGP63.

Invención 9: reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 7-9, 11, 14-18, todas parcialmente y 6, 10, 12 completas. Comprende el uso de KMP11, PFR2 y TGP63.

Invención 10: reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 8, 9, 14-18, todas parcialmente y 6, 7, 10-12 completas. Comprende el uso de HSP70, PFR2 y TGP63.

Invención 11: reivindicaciones 1-18, completas. Se basa en el uso de los cuatro antígenos, KMP11, HSP70, PFR2 y TGP63.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2010/070376

| Documento de patente citado en el informe de búsqueda | Fecha de Publicación | Miembro(s) de la familia de patentes | Fecha de Publicación |
|---|----------------------|--------------------------------------|----------------------|
| WO 2009017736 A | 05.02.2009 | CA 2700000 A | 05.02.2009 |
| | | EP 2182979 A | 12.05.2010 |
| WO 2007056114 AB | 18.05.2007 | CA 2628315 A | 18.05.2007 |
| | | AU 2006311873 A | 18.05.2007 |
| | | EP 1945248 A | 23.07.2008 |
| | | US 7695925 B | 13.04.2010 |