



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 236**

21 Número de solicitud: 200901403

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/44 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **03.06.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2010**

Fecha de la concesión: **18.01.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **28.01.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.01.2011

73 Titular/es: **Universidad de Granada
Hospital Real - Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES**

72 Inventor/es: **Pablos Torró, Luis Miguel de;
Osuna Carrillo de Albornoz, Antonio y
González González, Gloria Maribel**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Uso de la proteína Masp 52 para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas.**

57 Resumen:

Uso de la proteína Masp 52 para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas. Se propone el uso de la proteína Masp52, de la familia MASP (Mucin associated Surface proteins) para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas, incluyendo un método de detección de la presencia del parásito *T. cruzi* en un individuo, un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y un kit de diagnóstico que comprende los elementos necesarios para analizar la cantidad de proteína Masp52 en una muestra biológica.

ES 2 343 236 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de la proteína Masp 52 para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y de la medicina, y específicamente se refiere al uso de una proteína de la familia MASP (*Mucin associated Surface proteins*) para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas.

10 **Estado de la técnica anterior**

La enfermedad de Chagas (enfermedad de Chagas-Mazza, mal de Chagas o tripanosomiasis americana), es una enfermedad parasitaria tropical principalmente del Centro y Sudamérica, generalmente crónica, y cuyo agente etiológico es el *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 Latino América, actualmente se encuentra en expansión como consecuencia de los procesos migratorios, por lo que ha sido necesario la implantación de pruebas diagnosticas 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).

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, siendo las formas Tripomastigote metacíclico la fase infectivas en el ciclo de vida del protozoo encargada de dicha invasión celular. El parásito transmitido al hospedador vertebrado en las heces del insecto es llamado en esta etapa, por tanto, tripomastigote metacíclico. En la sangre, el parásito se observa como un tripomastigote fusiforme, en forma de "C" o de "S" de 20 μm de largo por 1 μm de anchura. Durante esta etapa, el tripomastigote no se multiplica en la sangre del hospedero. Cuando el parásito infecta las fibras del músculo cardiaco estriado o a los fagocitos, 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 "nidios" 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, pero no son capaces de multiplicarse en la sangre ya que la única forma replicativa en el vertebrado es la forma amastigote intracelular, invadiendo otras células para repetir el ciclo.

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.

Cualquier proceso infeccioso biológico puede dividirse en diversos grados según su severidad y en función de los tratamientos necesarios para aliviar sus síntomas. En el caso de las infecciones causadas por *Trypanosoma cruzi* en el hombre, la enfermedad presenta dos estados severos: la fase aguda, poco después de la infección, y la fase crónica que puede desarrollarse incluso pasados diez años. En el caso de las infecciones causadas por *Trypanosoma cruzi*, algunos casos agudos (10 a 20%) 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, para reaparecer sólo varios años más tarde.

Los métodos de diagnóstico incluyen principalmente técnicas serológicas, y éstas pueden ser hemaglutinación directa o indirecta, IFA (inmunofluorescencia indirecta), reacción de fijación de complemento y ELISA, así como el examen microscópico de la interfase de células después de centrifugar la sangre (Stront y microStront), y el hemocultivo. Estos y otros métodos muestran diferente sensibilidad y especificidad. Durante la fase aguda el xenodiagnóstico es la prueba más sensible (92%), la cual puede ser usada también para el estudio de la susceptibilidad de los animales de laboratorio ante diferentes cepas de *T. cruzi*. Mientras el xenodiagnóstico se ha mostrado negativo después del tratamiento con tripanocidas efectivos, pruebas serológicas convencionales como la inmunofluorescencia y la fijación de complemento persisten positivas. Consecuentemente, la evaluación de la curación es aún controvertida. Por medio de la prueba de lisis mediada por el complemento (CML), se detectaron anticuerpos líticos (LA) de *T. cruzi* que se adosan a los epítomos de tripomastigotes vivos y están relacionados con la resistencia del huésped a la infección (Krettli *et al.*, 1982. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76(3):334-340). La serología de anticuerpos convencionales (CSA) detecta inmunoglobulinas en sueros de pacientes con infecciones chagásicas, pero a diferencia de los LA, no reconoce tripomastigotes vivos. La presencia de LA se ha usado como un importante criterio de evaluación de la enfermedad de Chagas.

Usando la citometría de flujo, se Introdujo un inmunométodo sensible para la detección de anticuerpos antitripomastigotes vivos ligados a la membrana (Martins-Filho *et al.* 1995. *Clin Diagn Lab Immunol* 2(5):569-573). Con

ES 2 343 236 B2

base en las pruebas serológicas (detección de LA -*lytic antibodies*- y CSA -*conventional serology antibodies*-) y en evaluaciones parasitológicas como hemocultivo (HE), es posible clasificar a los pacientes en:

- 5 a) pacientes no tratados infectados crónicamente (NT) y pacientes tratados no curados (TNC), con HE positivo y anticuerpos LA y CSA en su suero;
- b) pacientes “disociados” (DIS); es decir, con HE-negativo, en los cuales los LA no se detectan mientras los CSA están presentes;
- 10 c) pacientes curados (CUR), con HE-negativo, que no tienen anticuerpos LA ni CSA, y
- d) como control, un grupo de personas no chagásicas (NC).

15 Se examinan los sueros de los pacientes por incubación de tripomastigotes vivos del torrente circulatorio, los cuales han sido expuestos a isotiocianato de fluoresceína conjugado con inmunoglobulina G antihumano. Los parásitos se fijan, se corren en el citómetro y se identifican con base en su tamaño y sus granulaciones. Con la experiencia en la prueba de CLM se usa un nivel de 20% de parásitos positivos a la fluorescencia del conjugado como línea de corte entre los tratamientos efectivos y los no efectivos.

20 Es fundamental el diagnóstico diferencial que permita distinguir en que fase de desarrollo se encuentra la enfermedad, así como la monitorización del transcurso de la misma, especialmente en la fase crónica, para eliminar o reducir al mínimo los mecanismos autoinmunes, que causan efectos negativos e incluso letales, en los pacientes. Además, 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. Ambos poseen una baja tasa de curación y efectos secundarios.

30 La familia de proteínas MASPs (*Mucin associated Surface Proteins*) se describió por primera vez a raíz de la secuenciación del genoma entero del parásito *Trypanosoma cruzi*, y parece exclusiva del mismo. Tal y como se describe en El Sayed *et al.*, 2005. (*Science*, 309, 409), existen más de 1300 copias de genes MASP, (1377 genes identificados) y se han denominado así por encontrarse aguas debajo de las mucinas TeMUC II (subfamilia de mucinas de 884 miembros), y parecerse estructuralmente a ellas (aunque no a nivel de secuencia). De los 1377 genes MASPs indentificados, 771 parecen codificar regiones N-terminal y C-terminal bien conservadas, y 433 son pseudogenes. Aproximaciones con técnicas proteómicas no han sido capaces de detectar un gran número de estas proteínas, por lo que se piensa que pueden mostrar modificaciones post traduccionales similares a las de las mucinas, describiéndose como N-linked glicoproteins (Atwood III *et al.*, 2006. *J. Proteome Res.* 3376-3384), o que alternativamente, estos genes se expresen de una manera similar a las glicoproteínas variantes de superficie (VSGs) de *T. brucei* (Atwood III *et al.*, 2005. *Science* 309, 473-476).

40 Respecto a la inmunización frente a *T. cruzi*, existen diversas aproximaciones en el estado de la técnica, que abarcan desde parásitos atenuados en su virulencia hasta la inmunización génica. Así, Segura *et al.*, 1976 (*J. Parasitol.*, 62, 131-133) emplearon fracciones subcelulares de epimastigotes obtenidas a partir de centrifugación diferencial en gradientes de densidad de sacarosa. Snary *et al.*, 1981 (*Mol. Biochem. Parasitol.*, 3, 1-14) emplearon glicoproteínas de superficie de peso molecular de 72 kDa, que protegieron animales contra un desafío con tripomastigotes metacíclicos pero no contra un desafío con tripomastigotes sanguíneos. Scott *et al.*, 1982 (*Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76, 698-700) emplearon una glicoproteína, de peso molecular 90 kDa, que no cruza con tejidos de mamíferos e indujo protección y mayores niveles de reacción de hipersensibilidad retardada cuando se utiliza saponina como adyuvante (Scott *et al.*, 1984. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, 74, 373-377), pero no produjo negativización de la parasitemia, luego de un desafío con parásitos en ratones y monos. Una glicoproteína de similar peso molecular pero presente solamente en tipomastigotes metacíclicos fue mencionada como inductora de resistencia contra la infección aguda generando una respuesta inmune protectora satisfactoria (Yoshida *et al.*, 1990. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 39, 39-46). También se han empleado antígenos purificados de anticuerpos monoclonales (Gómez *et al.*, 1995. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 50, 57-69), proteínas purificadas a través de columnas de afinidad (Plumas-Marty *et al.*, 1993. *Res. Immunol.*, 144, 553-563), productos de excreción-secreción del parásito (Ouassi *et al.*, 1990. *Parasitol.*, 100, 115-124) como inmunógeno para inducir una respuesta capaz de anular el desarrollo de mecanismos evasivos del parásito para eludir la respuesta inmune (Taibi *et al.*, 1993. *J. Immunol.*, 151, 2676-2689).

60 La utilización de antígenos definidos purificados a partir del *T. cruzi* presenta la desventaja de su difícil obtención en volúmenes adecuados. La obtención de antígenos por técnicas de biología molecular y de ADN recombinante permitieron clonar, expresar y producir los antígenos de *T. cruzi* en volúmenes suficientes.

65 Así, proteínas conocidas como Amastigote Surface Protein-2 (ASP-2) (Silveira *et al.*, 2008. *Clin Vaccine Immunol.*, 15, 1292-300), y transialidasas (TS) unidas a motivos CpG (Hoft *et al.*, 2007. *J. Immunol.*, 10, 6889-900) o a adenovirus recombinantes con TS o ASP-2 (Machado *et al.*, 2006. *Hum Gene Ther.*, 17, 898-908) han sido utilizadas con niveles altos de protección frente al reto con *T. cruzi*. Sin embargo, la gran expansión de la familia Transialidasa a lo largo del genoma y su facilidad para mutar debido a la presión inmune, supone una dificultad a la hora de tratar la enfermedad debido a la gran variedad de cepas del parásito distribuidas por toda América Latina.

Además, el desarrollo de vacunas se ha visto dramáticamente limitado debido al debate de los mecanismos implicados en la enfermedad de Chagas. Así, algunos estudios parecen indicar que el daño tisular se debe a la replicación de los amastigotes intracelulares, mientras otros sugieren que se debe a la autoinmunidad inducida por los antígenos del parásito que mimetizan con proteínas del hospedador. Esta es una de las causas por las que no hay vacunas efectivas disponibles para la prevención de esta infección, y la perspectiva actual sobre el eventual desarrollo de las mismas es incierta. Además, los tratamientos actualmente disponibles presentan baja eficacia ($\geq 80\%$ de fracasos terapéuticos) en la fase crónica establecida de la enfermedad, y además la eficacia antiparasitaria de los compuestos varía según la región geográfica, probablemente como resultado de la diferente susceptibilidad intrínseca a las drogas de las cepas del *T. cruzi* que circulan en diferentes zonas endémicas. Por último, estos compuestos presentan frecuentemente efectos colaterales, que incluyen anorexia, vómitos, polineuropatía periférica y dermatopatía alérgica, y que pueden conllevar a la interrupción del tratamiento.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar un método de diagnóstico de la enfermedad de Chagas, de elevada sensibilidad y especificidad, y que permita clasificar a los pacientes de acuerdo con el estadio de su enfermedad, así como de un método de tratamiento y prevención adecuado y eficaz frente a dicha enfermedad.

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han purificado y caracterizado una proteína de 52 kDa secretada al medio durante la interacción *T. cruzi* -célula hospedadora, perteneciente a esta familia de proteínas y que han denominado como Masp52.

La detección de esta proteína permite diferenciar las distintas formas de *Trypanosoma cruzi*, tanto cuantitativamente (detección de una única banda con diferente grado de expresión en los diferentes estadios del parásito mediante electroforesis SDS PAGE y su posterior análisis mediante *Western blot* empleando las IgG anti-centro catalítico de la Masp52 (CR), ó mediante el estudio de los mRNA mediante RTqPCR como cualitativamente (empleando las IgG anti-péptido señal (SP), para observar el patrón de expresión de proteínas de la familia MASP mediante *Western blot*). De esta manera, se podrían establecer unos valores de referencia que permitieran la clasificación de los pacientes chagásicos en distintos grupos en función de la fase de la enfermedad, así como de la severidad de la misma y el pronóstico post-tratamiento.

Así pues, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de detección de la presencia del parásito *T. cruzi* en un individuo, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada de dicho individuo,
- b) detectar la proteína Masp52 en la muestra biológica aislada de (a).

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

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. Más preferiblemente, el fluido biológico es sangre o plasma o suero sanguíneo. El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. La detección de esta proteína en una muestra biológica aislada de un sujeto es indicativa de la presencia del parásito *T. cruzi*. El primer método de la invención permite por tanto la detección de *T. cruzi* en una muestra biológica cualquier organismo capaz de ser parasitado por *T. cruzi*, incluyendo por tanto los vectores y los reservorios. En una realización preferida, el organismo donde se detecta la presencia o ausencia del parásito *T. cruzi* es un mamífero. En otra realización aún más preferida es un mamífero humano (hombre).

La proteína Masp52 pertenece a la familia de proteínas MASPs (*Mucin associated Surface proteins*).

En el contexto de la presente invención, el término "proteína Masp52" se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que puede comprender diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucléico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,
- b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucléico 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. En las que el polipéptido

codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína Masp52. Incluye, por tanto, diversas variantes de la proteína Masp52, esto es, proteínas resultantes de modificaciones postranscripcionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación. El término “variante” se define más adelante en esta memoria.

5

La detección de la proteína Masp52 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 esta proteína de manera semi-cuantitativa o cuantitativa permiten diferenciar entre los diferentes estadios del parásito. De esta manera, se podría establecer un diagnóstico diferencial en individuos afectados por la enfermedad de Chagas, que permitiría subclasificarlos. Esta subclasificación, a su vez, permitiría el establecimiento y la adecuación del tratamiento de manera individualizada. Por ejemplo, la expresión de la Masp52 en los diferentes estadios de *T. cruzi* se puede realizar mediante electroforesis SDS PAGE, y su posterior análisis mediante Western blot empleando las IgG anti-CR, nos muestra como esta proteína se reconoce como una única banda con diferente grado de expresión en los diferentes estadios del parásito. Así, la expresión en trypomastigotes metacíclicos podría ser del orden de 12 veces superior que la encontrada en epimastigotes, cinco veces superior a la de amastigotes y dos veces superior a la encontrada en trypomastigotes derivados de cultivos celulares. Cuando el reconocimiento en las cuatro fases de *T. cruzi* se realiza empleando las IgG anti-SP, para observar el patrón de expresión de proteínas de la familia MASP mediante *Western blot*, se obtuvo la expresión de 6 bandas en los trypomastigotes metacíclicos, 4 bandas en las formas trypomastigotas, 3 bandas en los amastigotes y 3 bandas en los epimastigotes, aunque en estos últimos el nivel de expresión fue muy bajo. El resultado del estudio de los mRNA mediante RTqPCR mostró que todos los estadios poseían síntesis del mRNA específico de la proteína Masp 52, pero con diferentes niveles de expresión. En las formas trypomastigotas metacíclicas la síntesis de mRNA específico podría ser del orden de tres veces superior a la de trypomastigote derivado de tejidos, once veces mayor a la de amastigotes y cincuenta veces superior a la de los epimastigotes.

Así pues, otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo,
- b) detectar la cantidad de proteína Masp52 presente en la muestra biológica aislada de (a).

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

- c) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

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 computarizada en el paso (c). Además de los pasos especificados anteriormente puede comprender otros pasos adicionales, por ejemplo relacionados con el pre-tratamiento de la muestra o la evaluación de los resultados obtenidos mediante estos métodos.

El término “diagnóstico”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la capacidad de detectar la presencia de *Trypanosoma cruzi* parasitando un individuo, preferiblemente en un animal, más preferiblemente en un mamífero y aún más preferiblemente en un humano. Se refiere también, en una realización más preferida, a la capacidad de discriminar 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 segundo método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, permitiendo, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos adecuados. Esta detección 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.

60

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 la proteína, basada en una señal que se obtiene directamente de la proteína, y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de la proteína, 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 la proteína. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto del producto de la expresión génica) o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

65

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de la proteína, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con las mismas o que pueda derivarse de éstas. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de la proteína obtenida mediante medida directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopia de masas o resonancia magnética nuclear. 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.

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de proteína Masp52 de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de proteína Masp52 de una muestra 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) de los métodos de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término “cantidad de referencia”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad de la cantidad absoluta o relativa de las formas de proteína Masp52 que permite discriminar un estadio de *T. cruzi* 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.

La muestra de referencia puede ser, por ejemplo, un extracto de proteínas obtenido 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.

En una realización preferida, la detección de la cantidad de proteína Masp52 se realiza mediante la incubación con un anticuerpo específico en un inmunoensayo. El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con la muestra obtenida. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunohistoquímica o *chips* de proteína.

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 (inmunorreacciona) con la proteína Masp52. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epitopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de la proteína Masp52 y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de la recombinación homóloga. Hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE).

Anticuerpos que reconocen a la proteína Masp52 o a determinados fragmentos o variantes de la misma se describen, pero sin limitarse, en los ejemplos de la presente memoria. Estos anticuerpos 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 *immunoblot* o *Western blot*. Para llevar a cabo un *Western blot*, se obtiene un extracto de proteínas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto y se separan las proteínas en un medio de soporte capaz de retenerlas mediante electroforesis. Una vez separadas las proteínas se transfieren a un soporte diferente donde pueden ser detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen a la proteína Masp52. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, la proteína Masp52 se detecta mediante *Western blot* empleando IgG anti-CR. En otra realización preferida, la proteína Masp52 se detecta mediante *Western blot* empleando IgG anti-SP.

La separación de las proteínas se suele realizar mediante electroforesis. La electroforesis es una técnica analítica de separación de fundamento cinético basada en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en un determinado medio (solución tampón de electroforesis), a través de una matriz o soporte reticulado como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula viene dado por su movilidad electroforética y ésta por la carga, tamaño y forma de la misma. Cuanto mayor es la relación carga/tamaño más rápido migra un ión en el seno del campo eléctrico. Existen numerosas variaciones de esta técnica en función del equipo utilizado, soporte

ES 2 343 236 B2

y condiciones físico-químicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación. Algunas variaciones de esta técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse, electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), isoelectroenfoque o electroforesis bidimensional. La electroforesis PAGE puede llevarse a cabo en condiciones desnaturizantes o no desnaturizantes. Preferiblemente, para llevar a cabo la detección de la cantidad de proteína Masp52 mediante *Western blot*, las proteínas obtenidas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto se separan mediante electroforesis monodimensional PAGE en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Alternativamente, las proteínas obtenidas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto se pueden separar mediante electroforesis bidimensional o 2D-PAGE. Esta técnica, se basa en la separación de las proteínas en función a dos características: en primer lugar, se separan las proteínas según su punto isoeléctrico (pI) mediante isoelectroenfoque (IEF) y, en segundo lugar, la separación se realiza según su masa molecular, mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). La técnica DIGE (*Differential In Gel Electrophoresis*) se basa en el mareaje de las proteínas de las muestras de estudio con uno de los tres fluorocromos (Cy2, Cy3 o Cy5) antes de la separación. A continuación se mezclan las muestras y se separan en un único gel bidimensional, minimizando la variabilidad experimental. Debido al mareaje específico de cada muestra pueden observarse de manera individualizada y realizar un análisis comparativo de la expresión diferencial de proteínas, permitiendo la cuantificación precisa.

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis, y antes de la detección, las proteínas se transfieren a un soporte o a una membrana, por ejemplo, pero sin limitarse, PDVF, nitrocelulosa o acetato de celulosa. Esta membrana se hibrida con un anticuerpo específico (también llamado anticuerpo primario) que reconoce a la proteína Masp52. A continuación, la membrana se hibrida con un anticuerpo (también llamado anticuerpo secundario) capaz de reconocer de manera específica el anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En otra realización preferida, es el anticuerpo que reconoce a la proteína Masp52 el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario. Una vez detectada la proteína, se puede determinar su tamaño molecular relativo, comparando su migración con la migración de una proteína control que se detecte de forma simultánea, preferiblemente en el mismo soporte, que tiene un tamaño conocido.

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 inmunoreactivo (antígeno de la muestra biológica o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador.

Existen diferentes tipos de ELISA. En el ELISA directo o ensayo ELISA simple de dos capas, el soporte sólido se recubre con la muestra biológica y se incuba con un anticuerpo que reconoce a la proteína Masp52, conjugado o unido a un compuesto marcador. En el ELISA indirecto, el soporte sólido se recubre con la muestra biológica y se incuba con un anticuerpo primario, que reconoce a la proteína Masp52 y, a continuación, un anticuerpo secundario, que reconoce al anticuerpo primario, conjugado o unido a un compuesto marcador. En el ELISA *sandwich* o ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos, se recubre el pocillo con un primer anticuerpo que reconoce la proteína Masp52, se aplica la muestra biológica problema, de manera que la proteína Masp52 será retenida en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo, y después se le aplica un segundo anticuerpo que reconoce a la proteína Masp52, conjugado o unido a un compuesto marcador.

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 la proteína Masp52. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ³³P o ³⁵S, fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

La detección cuantitativa de la proteína Masp52 puede realizarse también mediante PCR en tiempo real (RT-PCR ó RTqPCR). La detección en tiempo real de los productos amplificados puede llevarse a cabo mediante la utilización de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de cadena doble o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas. Así, en otra realización preferida, la proteína Masp52 se detecta mediante RTqPCR empleando los cebadores SEQ ID NO: 2 (cebador MASP.220F) y SEQ ID NO: 3 (cebador MASP.220R).

Otro aspecto de la presente invención es un kit o dispositivo diagnóstico, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende los elementos necesarios para analizar la cantidad de proteína Masp52 en una muestra biológica. En una realización preferida, el kit de la invención además comprende los elementos necesarios para comparar la cantidad detectada en (a) con una cantidad de referencia. En otra realización más preferida, comprende los elementos adecuados 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 proteína Masp52 por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento como, por ejemplo, pero sin limitarse, anticuerpos específicos de la proteína Masp52, anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. El kit

ES 2 343 236 B2

además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. En el caso de la detección por RTqPCR puede contener, pero sin limitarse, cebadores, sondas y todos aquellos reactivos necesarios para determinar la expresión de la proteína Masp52. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, 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 los métodos de la invención.

Los autores de la presente invención también han demostrado, como se recoge en los ejemplos, que el empleo de anticuerpos humorales (IgG) específicos frente a la región catalítica (a partir de ahora denominados anti-CR) a dilución 1/50, 1/100 y 1/200, son capaces de inhibir la invasión celular por parte de *Trypomastigotes* metacíclicos.

La proteína Masp52 o cualquiera de sus variantes se puede formular en composiciones para usar como inmunógeno (de aquí en adelante, inmunógenos de la invención). Estos inmunógenos pueden también ser usados como vacunas en animales, y más particularmente en mamíferos, incluyendo humanos, o producir una respuesta en la producción de anticuerpos en animales. Para la formulación de tales composiciones, una cantidad efectiva inmunológicamente de la proteína Masp52 o de cualquiera de sus variantes es mezclada con un transportador adecuado aceptable fisiológicamente para la administración a mamíferos incluyendo humanos. Los inmunógenos pueden estar covalentemente ligados entre ellos, a otros péptidos, a una proteína transportadora o con otros transportadores, incorporados en liposomas u otras vesículas similares, y/o mezclados con un adyuvante o absorbente como es conocido en el campo de las vacunas. Por ejemplo, pueden ser mezclados con otros complejos inmunoestimuladores. Alternativamente, los inmunógenos no están acoplados y meramente mezclados con un transportador aceptable fisiológicamente tal como un compuesto tampón o salino normal adecuado para la administración a mamíferos incluyendo humanos.

Por tanto, otro aspecto de la Invención se refiere al uso la proteína Masp52 aislada, o cualquiera de sus variantes, para la elaboración de un medicamento, o a la proteína Masp52, o cualquiera de sus variantes, para su uso como medicamento. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso la proteína Masp52 aislada, o cualquiera de sus variantes, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Chagas, o a la proteína Masp52, o cualquiera de sus variantes, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Chagas.

El término “aislado” se refiere a un material (ácido nucleico, péptido o una proteína) que se encuentra: (1) sustancialmente o completamente libre de los componentes que normalmente lo acompañan o interactúan con él en su forma natural. El material aislado puede opcionalmente comprender otro material que no se encuentra asociado con el aislado en su forma natural; o bien (2) en caso de que el material se encuentre en su medio natural, dicho material ha sido alterado de manera sintética por una intervención humana deliberada que modifica su composición. La alteración que da lugar a la forma sintética del material puede ser dirigida al material (ácido nucleico y/o proteína) o al entorno natural.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “variante” se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a la proteína Masp52. 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.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es “sustancialmente homóloga a la proteína Masp52” cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferiblemente de, al menos un 90%, más preferiblemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferiblemente de, al menos, un 99%.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias aminoacídicas que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias, que incluye, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1999)).

El término “fragmento”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una porción de la proteína Masp52 o de una sus variantes.

La expresión “funcionalmente equivalente”, tal como aquí se utiliza, significa que la proteína o el fragmento de la proteína en cuestión mantiene esencialmente las propiedades inmunológicas descritas en este documento. Dichas propiedades inmunológicas se pueden determinar mediante métodos convencionales tales como los descritos en los ejemplos que acompañan a esta descripción.

Como se ha descrito anteriormente, los inmunógenos de la invención presentan secuencias antigénicas protectoras. Estos antígenos protectores son capaces de generar una respuesta inmune (inmunogénica) protectora del hospedador, es decir, una respuesta del hospedador que conduce a la generación de moléculas efectoras inmunes, anticuerpos o células que dañan, inhiben o matan a la entidad biológica invasora, “protegiendo” así al hospedador de una enfer-

edad clínica o sub-clínica y de una pérdida de productividad. Tal respuesta inmune protectora puede manifestarse comúnmente por la generación de anticuerpos.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a los anticuerpos generados por la inmunización, con la proteína Masp52 o cualquiera de sus variantes, del animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un mamífero humano. En otro aspecto de la invención, los anticuerpos producidos tras la inmunización del animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente humano, denominados de aquí en adelante anticuerpos de la invención, son usados como medicamento, esto es, este aspecto se refiere al uso de los anticuerpos de la invención en la elaboración de un medicamento. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de los anticuerpos de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, o a los anticuerpos de la invención para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Los anticuerpos de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas. Así, los anticuerpos pueden estar en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, los anticuerpos pueden prepararse para su administración en forma sólida. Los anticuerpos pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Los anticuerpos o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas. Tales medios incluyen, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

La dosificación de anticuerpos para obtener una cantidad farmacéuticamente eficaz depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia, etc. del animal, preferiblemente mamífero, y más preferiblemente humano.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de aquí en adelante composición de la invención, que comprende la proteína Masp52 aislada o cualquiera de sus variantes, un anticuerpo de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso como medicamento. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención se usa para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Chagas.

Más preferiblemente, la proteína Masp52 aislada, o cualquiera de sus variantes, se encuentran, o se traducen, en una cantidad terapéuticamente efectiva, capaz de generar anticuerpos para su uso en la elaboración de vacunas.

En el contexto de la presente invención el término “vacuna” se refiere a una preparación antigénica empleada para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad. Son preparados de antígenos que una vez dentro del organismo provocan la respuesta del sistema inmunitario, mediante la producción de anticuerpos, y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria.

El término “antígeno” en esta memoria se refiere a una molécula (generalmente una proteína o un polisacárido), que puede inducir la formación de anticuerpos. Hay muchos tipos de moléculas diferentes que pueden actuar de antígenos, como las proteínas o péptidos, los polisacáridos y, más raramente, otras moléculas como los ácidos nucleicos. En concreto, en esta memoria, se refiere a la proteína Masp52 o a cualquiera de sus variantes.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. Incluye, por tanto, los anticuerpos anti-CR que impiden la entrada de los tripomastigotes metacíclicos en la célula. En el contexto de la presente invención se refiere también a la proteína Masp52 o a cualquiera de sus variantes, que son capaces de generar una respuesta inmune frente a un organismo dado, que está causando dicha enfermedad en el hombre o los animales. Incluye, por tanto, lo que se conoce como vacuna, tal y como se ha definido previamente en esta memoria.

Por tanto, en otra realización preferida, la composición de la invención además comprende excipientes farmacológicamente aceptables. En otra realización más preferida, la composición de la invención adicionalmente comprende otro principio activo. En una realización más preferida, la composición de la invención es una vacuna, de aquí en adelante vacuna de la invención. En otra realización aún más preferida, la vacuna comprende un adyuvante.

En esta memoria se entiende por “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” o “ingrediente farmacéuticamente activo” cualquier sustancia o mezcla de sustancias que está dotada de actividad farmacológica, metabólica o inmunológica, u otro efecto directo en la diagnosis, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad o condición médica, o que afecta a la estructura o función del cuerpo.

En esta memoria, el término “adyuvante” se refiere a un agente, mientras no posea un efecto antigénico por sí mismo, que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la vacuna. Aunque sin limitarse a ellas, las sales de aluminio “fosfato de aluminio” e “hidróxido de aluminio” son los dos adyuvantes más comúnmente empleados en las vacunas. Otras sustancias, como por ejemplo el escualeno, también se pueden emplear como adyuvantes.

Un método alternativo de la producción de vacunas es el uso de técnicas de biología molecular para producir una proteína de fusión que contiene una o varias de las secuencias aminoácídicas de la presente invención y un péptido o proteína altamente inmunogénico/a, frente a una determinada infección. Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, la vacuna de la invención presenta un origen recombinante.

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. Muestra el SDS-PAGE 12.5% y tinción con nitrato de plata de las proteínas purificadas mediante WGL-Agarosa del Excretion Secretion Product (ESP) y de la fracción purificada mediante Wheat Germ Lectin.

Fig. 2. Muestra el MALDI-TOF obtenido tras la digestión con trypsin de la Masp52 y matches obtenidos con la Masp52 tras la búsqueda de secuencias homologas con el MASCOT 2.0 software (Matrix Science) integrado con el software Biotool 2.2.

Fig. 3. Muestra los motivos estructurales y composición encontrados mediante el servidor de herramientas proteómicas de Expasy (<http://expasy.org>). Existen dos regiones transmembrana en N- y C-terminal, un péptido señal (SEQ ID NO: 4) del aminoácido 1 al 25, un motivo ATP/GTP-binding site motif A (P-loop) (SEQ ID NO: 5) del 159 a 166 y un N-glicosilación site (SEQ ID NO: 6) del 465 a 473 B) Plot de hidrofobicidad para la Masp52 según la escala Kyte-Doolittle de hidrofobicidades.

Fig. 4. Muestra el *Western blot* de las formas trypomastigotes metacíclicos (M), trypomastigote proveniente de los cultivos celulares (T), amastigotes (A), epimastigote (E) y del Excretion-secretion product (ESP) de *Trypanosoma cruzi* usando las IgG anti-CR B) *Western blot* frente a las IgG anti-SP de las formas trypomastigotes metacíclicos (M), trypomastigote proveniente de los cultivos celulares (T), amastigotes (A) y epimastigote (E).

Fig. 5. Muestra la RTqPCR para cuantificar la cantidad relativa de ARNm transcrito de la Masp52 comparándolo frente a la expresión de 18S ribosomal según el método de ΔCT . Se midió la cantidad relativa para las fases trypomastigote metacíclico, trypomastigote derivado de cultivo celular, amastigote y epimastigote.

Fig. 6. Muestra el microscopia Láser con Focal de la Masp52 usando las IgG anti-CR. A) Mareaje para los distintos estadios del parásito, Trypomastigote derivado de cultivo celular stumpy forms (A) Trypomastigote metacíclico (C), Epimastigote (D) y Amastigote (E). Barra = 5 μm B) Mareaje de trypomastigotes metacíclicos tras 2 horas de interacción con la célula hospedadora. Se observa el momento de interacción célula-parásito. Barra= 5 μm (Fig. 6 B1), Barra= 10 μm (Fig. 6 B2) C) Mareaje para células infectadas por *T. cruzi* conteniendo amastigotes en su interior. Barra= 5 μm

Fig. 7. Muestra la inmunocitoquímica de la Masp52 usando las IgG anti-CR A) Flagelar Pocket de Trypomastigote derivado de cultivo celular B) Flagellar Pocket de Trypomastigote Metacíclico C) Vacuolas de Trypomastigote metacíclico D) Trypomastigote derivado de cultivo celular, localización en membrana, citosol y exterior celular E) Control negativo. Barra= 0.25 μm

Fig. 8. Muestra el efecto tras 4 horas de interacción con células Vero de partículas de bentonita adsorbidas a la Masp52 y BSA como control localizándolas empleando IgG anti CR y suero policlonal anti BSA A) Mareaje de la Masp52 Vemos una distribución por el citosol celular (flechas) de las partículas B) Mareaje de la BSA. No observamos presencia de proteínas en las células.

Fig. 9. Muestra el efecto de anticuerpos frente a la Masp 52 en la invasividad de trypomastigotes metacíclicos. Ensayamos con las IgG anti-CR a dilución 1/50, 1/100 y 1/200, incubándolo durante media hora con los Trypomastigotes metacíclicos y tras lavar los parásitos del suero, dejándolos interaccionar durante 2 horas frente a células Vero. Las barras representan la media \pm la desviación estándar de triplicados para cada dilución. Para encontrar si existen diferencias significativas entre los grupos de datos se empleó el test de Bonferroni.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad de la detección de la proteína Masp52 en la obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas.

*Material y métodos**Cepas del parasite, cultivos y células empleadas*

5 La cepa de *Trypanosoma cruzi* usada en estos experimentos fue la cepa PAN2, (aislada de un paciente varón de 32 años residente en el Distrito de Arraiján, comunidad de Burunga, Panamá), donada en 2006 por la Dra A.Ying de la Universidad de Panamá y mantenida por criopreservación desde ese momento.

10 Las formas epimastigote fueron crecidas en cultivo a 28°C en medio MTT suplementado con 10% Suero Bovino Fetal Inactivado (SBFI) (Ruiz-Perez *et al.*, 1986. *Arzneimittel Forschung* 36: 13-16). Las formas infectivas tripomastigote metacíclico fueron obtenidas “*in vitro*” en Medio Grace modificado, de acuerdo a Osuna *et al.* 1979. *Rev Iber Parasitol* 39: 129-133, y Osuna *et al.*, 1990 *International Journal of Parasitology*. 20 (5):673-676.

15 Las Células Vero Hospedadoras (ECACC 84113001) fueron cultivadas a 37°C 5% CO₂ en frascos de plástico de 75 cm² (Costar) conteniendo Dulbecco’s modified Eagle’s médium (DMEM, Gibco), suplementado con 10% v/v SBFI (Gibco).El procedimiento para infectar las células hospedadoras se desarrolló de acuerdo a Osuna A *et al*, 1984 (*Inter. J. for Parasitol.* 14(3):253-257). Las formas tripomastigote metacíclico obtenidas “*in vitro*” se resuspendieron en medio DMEM sin suero y añadidas a un cultivo de células. La relación parásito-célula se ajustó a 5:1 y la infección se realizó por 12 h 37°C. Se lavaron los cultivos con medio de cultivo para eliminar los tripomastigotes metacíclicos que no hubieran penetrado. Las células infectadas fueron cultivadas en medio DMEM 10% SBFI (pH:7.2).

20 Las formas tripomastigote fueron obtenidas de cultivos de células Vero previamente infectadas con las formas metacíclicas de *T. cruzi*. Después de 96 h de infección el sobrenadante conteniendo a los tripomastigotes se centrifugó a 300 g durante 10 min. El botón con las formas tripomastigote se resuspendió en medio DMEM y se centrifugó dos veces para obtener las formas parasitarias.

30 Los cultivos infectados fueron mantenidos por 8 días, después las formas amastigote se purificaron por gradiente discontinuo (1.100, 1.090, 1.080, 1.070 g/ml) y se prepararon como se describe a continuación. Las formas amastigote purificadas se colectaron de la interfase 1.070/1.080 g/ml.

Todas las formas del ciclo biológico de *T. cruzi* empleados en el desarrollo del trabajo fueron purificadas en gradiente discontinuo de percoll según se describe en Gil *et al.*, 2003 (*Parasitol Res* 90: 268-272) y poseían al menos, un 95% de pureza comprobada tanto bajo tinción como mediante recuento en cámara de Neubauer.

35 *Purificación de la Masp52 y secuenciación*

La obtención y purificación de la Masp52, fue realizada a partir del excretion-secretion product (ESP) durante la interacción célula-parásito. Para ello, cultivos semiconfluentes de células Vero les fue retirado el medio y tras lavarlas repetidas veces en DMEM sin suero, fueron infectados con una suspensión de formas tripomastigotes metacíclicos del parásito en DMEM sin suero con una relación, condiciones y tiempo de infección igual a como se ha citado anteriormente.

45 Trascurrido el periodo de interacción, y retirado el medio, fue centrifugado a 1500 g 10 minutos a 4°C a fin de eliminar formas del parásito que no hubiesen penetrado y filtrado el sobrenadante a través de un filtro de 0.22 µm de diámetro (Sartorius, Sartolab 20).

50 Las proteínas del ESP fueron concentradas con filtros de exclusión molecular de 5 kDa (Amicon,™ ultra, Millipore) y cromatografiadas posteriormente a través de la columna mono P 5/200GL (GE) con polybuffer 96 (GE) con fase líquida, recogiendo las fracciones comprendidas entre los pl de 5.2 a 4.6. Dichas fracciones fueron cromatografiadas nuevamente a través de una columna de Wheat Germ Lectin-Agarosa (WGL) (Sigma) a fin de purificar las proteínas N-glicosiladas. Como buffer de lavado se utilizó un Tampón Carbonato 0.1M pH: 9, y como eluyente de la fracción unida a la lectina, 2 volúmenes de N-Acetilglucosamina 0.5 M (Sigma) en Tampón Carbonato. Todas las cromatografías fueron realizadas en un equipo AKTA™ Purifier (GE).

55 El resultado de la cromatografía fue evaluado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS_PAGE al 12.5%. como se describe mas adelante.

60 La secuenciación e identificación de la Masp52 se llevó a cabo en por el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid. La banda de interés fue recortada de forma manual minimizando la cantidad de gel. Digiriéndose “*in-situ*” en modo automático (empleando un robot-digestor Bruker) mediante tripsina empleando un protocolo basado en el descrito por Shevchenko *et al.*, 1996. *Anal. Chem.* 68:850-858. El sobrenadante de la digestión (que contiene los péptidos) se acidifico con TFA (0.1% concentración final) secándose en un Speed-vac para resuspenderlo en 5 ml de TA (Trifluoroacetic acid 0.1% Acetonitrilo 33%). Una pequeña alícuota (0.5 ml) se deposito en una placa “Anchor-chip” (Bruker) empleando DHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid) como matriz a una concentración de 5 g/l mediante el método “*fast evaporation*”. La placa fue medida en un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF (matriz-assisted láser desorption/ionisation/time-of-flight), modelo autoflex (Bruker) equipado con reflector. Los espectros de masas obtenidos se utilizaron como “huella peptídica” para la identificación de proteínas en las bases de datos utilizando los motores de búsqueda accesibles en la red (Mascot, Profound).

ES 2 343 236 B2

Búsqueda de homologías y motivos estructurales

La homología de la secuencia aminoacídica y nucleotídica fue estudiada mediante la base de datos del genoma de *T. cruzi* en *T. cruzi*DB (<http://tcruzidb.org/tcruzidb/>) usando los algoritmos BLASTP y BLASTN en GenBank, del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La búsqueda de motivos estructurales se realizó mediante el servidor de herramientas proteómicas de Expasy (<http://expasy.org>) con los programas: Motif Sean para la búsqueda de motivos estructurales; SignalP 3.0 para la búsqueda de la secuencia señal; Tm Pred para la secuencia transmembrana y ProtScale para predecir la hidrofobicidad de nuestra secuencia usando la escala Kyte-Doolittle de hidrofobicidades.

Síntesis de péptidos sintéticos y obtención de anticuerpos

La síntesis de los péptidos diseñados fue llevada a cabo en el servicio de proteómica del CBM. Se diseñaron dos péptidos correspondientes a las zonas N-proximal (peptido señal) de los residuos 1-25 y de la zona catalítica de la Masp52 (ATP/GTP binding motif A) de los residuos 159 a 181.

Cada péptido fue usado para inmunizar 5 ratones Balb/c hembra por inoculación intraperitoneal de 50 µg del péptido, de acuerdo con el protocolo descrito por Espino *et al.*, 2007. (*Exp Parasitol.* 2007 Sep;117(1):65-73. Epub 2007 Mar 27). Tres semanas después de la primera inmunización se evaluó el título de anticuerpos mediante test de ELISA indirecto. Posteriormente, purificamos las IgG tanto del suero policlonal frente a los péptidos sintéticos, como de un suero de ratón preinmune mediante el Kit Protein A HP Spin Trap (GE health care). Posteriormente las IgG específicas fueron obtenidas fueron purificadas a través de una columna de afinidad usando el antígeno inmovilizado en una columna de Sepharose BrCN (GE) La concentración de las IgG purificadas fue ajustada a la original que contenía la muestra de suero. Las IgG específicas frente a la región catalítica lo denominaremos como anti-CR y frente al péptido señal como anti-SP.

Ensayo de invasión celular

Se infectaron Células Vero Semiconfluentes (3 x 10⁵ células/pocillo) con formas tripomastigotes metacíclicas. La relación parásito/célula fue de 5:1, desarrollándose la invasión 2 h a 37°C en DMEM sin suero con las diluciones 1/50, 1/100 y 1/200 de Ig anti-CR. Inmunoglobulinas de un suero preinmune de ratón fueron usadas como control. Al final del periodo de interacción, los cultivos fueron lavados, fijados en metanol y teñidos con el Preimmunized Diff-Quick (Medion Diagnostics, GMBH, CH-3186 Düringen). Después de ser teñidos, las células se estudiaron a microscopio para determinar el porcentaje de parasitación, adherencia y número de parásitos intracelulares. Se examinaron un mínimo de 500 células por pocillo, y cada experimento fue repetido al menos 3 veces, calculándose el número de células parasitadas y calculado la razón célula-parásito.

SDS-PAGE y análisis Western Blot

Los estudios de expresión de la Masp52 en las diferentes formas del ciclo de vida del parásito fue evaluado mediante inmunoblot en los distintos estadios, 5 x 10⁷ organismos de cada una de las fases del parásito se resuspendieron en 2 ml de tampón de tisis; 20 mM de PBS, 0.25 mM Sacarosa, 1 mM EDTA, 0.145 mM KCl, 1 mM DTT a pH: 7.4 mas un cocktail inhibidor de proteasa Complete Mini (Roche Molecular Biochemicals). Tras el tratamiento durante 10 min de los protozoos en dicho tampón, fueron sonicados a 0°C durante tres ciclos de 30 segundos y electroforesis en 12.5% de SDS-PAGE (Laemmli, 1970) con el PhastSystem (GE). La muestra de proteínas fue ajustada a la misma concentración, al objeto de que todos los pocillos de la electroforesis contuvieran la misma cantidad de proteínas y preparados en el mismo buffer (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0; 2.5% SDS y 17% glicerina y azul de bromofenol al 0.01%) y se calentó a 98°C 5 min.

Los Western blots se desarrollaron con membranas hidrofóbicas de polivinil difluorido (PVDF) (Hybond-P. Amersham) de acuerdo al método desarrollado por Towbin y Staehelin 1979. (*Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 4350-4354). Las manchas se expusieron a anti-CR o anti-SP (testados a 1:50) durante 2 h a 37°C seguidos de un conjugado con peroxidasa (Policlonal Goat Anti Mouse Inmunoglobulins HRP (DakoCytomation) durante 2 h a 37°C. La reacción se reveló con 3-3'-Diaminobencidina Tetrahidroclorídrica en tampón Tris HCl a pH 7.2. Los geles se digitalizaron y procesaron por QuantiScan software (Biosoft, Cambridge, U.K.) con el fin de cuantificar las bandas. En todos los casos la determinación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254).

Aislamiento del mRNA y desarrollo de RTqPCR

El mRNA total de los distintos estadios fue aislado usando el kit SV Total RNA Isolation (Promega), la calidad de las muestras fue verificada mediante geles de agarosa.

Para la transcripción reversa se empleó el iScript™cDNA Síntesis Kit (Biorad), que contiene oligo(dT) y random primers, para obtener un molde del RNA lo mas representativo posible.

La cuantificación de la expresión de la Masp52, fue evaluada realizando una RTqPCR utilizando el Kit Sensimix dT (Quantace). La cuantificación se realizó en todos los estadios del ciclo de vida estudiados.

ES 2 343 236 B2

Los primers utilizados fueron:

MASP.220F (SEQ ID NO: 2) y

MASP.220R (SEQ ID NO: 3)

que dan lugar a un amplicon de 198 pb (SEQ ID NO: 7). Para normalizar la cantidad de cDNA de Masp52 presente en cada muestra, se usaron los primers:

V1 (SEQ ID NO: 8) y

V2 (SEQ ID NO: 9)

para el gen 18S rRNA ribosomal (Clark y Pung, 1994. *Mol Biochem Parasitol* 66: 175-179), de *T. cruzi* obteniendo un amplicon de 179 pb (SEQ ID NO. 10). Las bandas obtenidas por PCR fueron confirmadas por secuenciación usando el BigDye[®] Terminator v 1.1 cyclesequencing kits (Applied Biosystems, CA, USA). La cuantificación relativa de las muestras se realizó, según el método de ΔC_T , en donde el Ratio 18S/Masp52 = $2^{CT_{18S} - CT_{Masp52}}$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Immunolocalización e inmunofluorescencia

La proteína fue localizada en las diferentes fases del ciclo de vida de *T. cruzi*, obtenidas como previamente hemos descrito. Los diferentes botones de las cuatro formas fueron lavados tres veces con 5 ml de PBS 0.125 M y fijados por 12 h a 4°C en 1% glutaraldehído y 2% de formaldehído en Tampón Cacodilato con 0.1 M de sacarosa (pH:7), siendo entonces embebidas en resina LRWhite.

Las muestras fueron incubadas con anticuerpo anti-CR 1 h a 37°C y tratados para visualizar la reacción antígeno-anticuerpo marcando el anticuerpo primario con un anticuerpo secundario anti-mouse IgG marcado con Oro(Sigma). Por último, la muestra fue teñida con acetato de uranilo bajo un microscopio de transmisión Zeiss EM-10C.

En aquellos experimentos en que se pretendió localizar la proteína en el interior de las formas del parásito o su localización durante el proceso de infección, las células o las formas del parásito fueron fijadas en acetona a -20°C, a las 2 horas de interacción parásito/célula, o tras 60 horas de haberse realizado la infección al objeto de observar la presencia y localización de la proteína en los amastigotes o en las células parasitadas. Una vez fijadas y lavadas con PBS, incubamos las preparaciones 1 h con las IgG anti-CR a una dilución a 1/100. Como anticuerpo secundario se empleó un anti mouse marcado con Fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma) en Tampón de Bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las preparaciones fueron tratadas durante 15 minutos con una solución de DAPI 10 µg/ml. Las preparaciones fueron montadas y preservadas en mounting médium (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes), observándose en un microscopio láser confocal Leica DMI6000 que incorpora un sistema de filtro para FITC (longitud media de onda 530 nm y máxima de 490 nm).

Adsorción de la Masp52 a partículas de Bentonita

Para la adsorción a partículas de bentonita se usó la técnica de Kagan & Norman's (1970. *Manual of Clinical Microbiology* 453-486) para seleccionar las partículas de bentonita para la adsorción de la Masp52. Una suspensión de 100 µl de partículas con un diámetro de 1 a 2 µm fue incubado 12 h a 4°C con 50 µl de una solución de 20 µg/ml proteína. Las partículas se adsorbieron a Albúmina Sérica Bovina (BSA) como control a la misma concentración y condiciones que las usadas como se describe a continuación. La Masp52 y la BSA adsorvida en partículas de bentonita fueron incubadas con células Vero (3×10^5) a 37° 4 h. Las células fueron lavadas con PBS y fijadas en acetona para estudiarlas mediante inmunofluorescencia, tratándose con una dilución 1/100 del anticuerpo anti CR y con un anticuerpo secundario anti mouse marcado con fluoresceína como se ha descrito anteriormente. En las células control se uso una dilución 1/100 de un suero policlonal en ratón anti BSA (Sigma) e igual anticuerpo secundario usado anteriormente. Como contracolorante se uso una solución de Azul de Evans al 0.01% estudiándose las preparaciones bajo microscopía de fluorescencia confocal como se ha descrito en el apartado anterior.

Resultados

1. Purificación, secuenciación y búsqueda de motivos estructurales de la masp52

Del proceso de purificación de proteínas procedentes del medio de interacción se obtuvieron por electroforesis dos bandas, una de 66 kDa y otra de 52 kDa, (Fig 1) que analizadas mediante MALDI-TOF MS y MS/MS correspondieron a albúmina bovina érica - *Bovine Serum Albumin* (BSA) - procedente de una de los medios de cultivo y la banda de 52 kDa que mediante un *Peptide mass fingerprinting* (PMF) o huella peptídica se encontraron 7 coincidencias, obteniendo un valor del 47.9% y un 17% de cobertura para la secuencia que se muestra en la figura N° 2. Dicha secuencia se encontraba en las bases de datos con el nombre de mucin-associated surface protein (MASP), putative y con un número de acceso EMBL: XP_820015.1, denominándola aquí como Masp52.

Realizada una búsqueda de posibles motivos estructurales presentes en la Masp 52 mediante el uso del servidor de herramientas proteómicas de Expasy (<http://expasy.org>), se obtuvo un péptido señal (aminoácidos 1-25), dos regiones transmembrana en los extremos N-Terminal (aminoácidos 9-28) y C-terminal (aminoácidos 493-510), un ATP/GTP-binding site motif A (P-loop) que podemos denominar como centro catalítico, (aminoácidos 159-166) y un sitio para N-glicosilación (465 a 470) (Fig. 3).

2. Expresión proteica, Western blot y RTqPCR

El análisis de la expresión de la Masp52 en los diferentes estadios de *T. cruzi* mediante electroforesis SDS PAGE y su posterior análisis mediante Western blot empleando las IgG anti-CR, nos muestra como esta proteína se reconoce como una única banda con diferente grado de expresión en los diferentes estadios del parásito (Fig. 4A). Así, la expresión en trypomastigotes metacíclicos es 12 veces superior que la encontrada en epimastigotes, cinco veces superior a la de amastigotes y dos veces superior a la encontrada en trypomastigotes derivados de cultivos celulares.

El resultado del estudio de los mRNA mediante RTqPCR mostró resultados similares (Fig. 5), todos los estadios poseían síntesis del mRNA específico de la Masp 52, pero con diferentes niveles de expresión. En las formas trypomastigotas metacíclicas la síntesis de mRNA específico es tres veces superior a la de trypomastigote derivado de tejidos, once veces mayor a la de amastigotes y cincuenta veces superior a la de los epimastigotes.

Por su parte, cuando el reconocimiento en las cuatro fases de *T. cruzi* se realizó empleando las IgG anti-SP, para observar el patrón de expresión de proteínas de la familia MASP mediante western blot, se obtuvo la expresión de 6 bandas en los trypomastigotes metacíclicos, 4 bandas en las formas trypomastigotas, 3 bandas en los amastigotes y 3 bandas en los epimastigotes, aunque en estos últimos el nivel de expresión fue muy bajo (Fig. 4B).

Mediante la misma técnica, empleando anticuerpos frente al dominio catalítico, se demuestra que la Masp52 es una proteína secretada, hallándose en el ESP de los trypomastigotes metacíclicos en su interacción con células Vero, sus membranas o las células Vero fijadas, lo que parece indicar dado de la ausencia de la proteína en los medios libres de células que dicha proteínas es segregada de una manera inducible al medio tras el contacto del parásito con las membranas de la célula.

3. Localización de la Masp52 en los distintos estadios de *T. cruzi* y adsorbida a partículas de bentonita

Los estudios llevados a cabo mediante microscopía láser confocal empleando las Inmunoglobulinas frente al centro catalítico mostró como se observa la presencia de la Masp 52 tanto en el citosol como ligada a la membrana plasmática en los distintos estadios del parásito, como se aprecia en la Fig. 6 A.

En aquellas preparaciones donde el estudio de la inmunolocalización de la proteína se realizó durante el proceso de interacción trypomastigotes metacíclicos-célula, se observó igualmente la presencia de la proteína en el citosol de los trypomastigotes, detectándose la proteína en el punto de contacto entre el parásito y la célula. La fluorescencia se observó igualmente dispersa en el citoplasma de la célula huésped junto a la presencia del parásito (Fig. 6B).

En aquellas células donde las formas del parásito ya se habían transformado y multiplicado como formas amastigota, se observó como la Masp52 aparece rodeando los amastigotes en el espacio entre el parásito y el citoplasma de la célula hospedadora (Fig. 6C).

Los estudios de localización ultraestructural en los diferentes estadios (trypomastigote, metacíclico trypomastigote derivado de cultivo celular y epimastigote), empleando las IgG frente al dominio catalítico de la Masp52, se observa como las marcas de oro se localizan tanto en la membrana del parásito, como en el citosol, siendo mayor el número de partículas en los estadios con alta capacidad infectiva, es decir los trypomastigotas (Fig. 7A, 7C). Los agregados de marcas se localizan en el interior de vacuolas (Fig. 7B), próximas al Flagellar Pocket y de la raíz del flagelo en las formas infectantes (Fig. 7A y C), mientras que la Masp52 aparece en los amastigotes en el citosol.

Estudios de microscopía óptica de láser confocal usando los anticuerpos anti CR o anti BSA como control en la interacción entre Masp52 adsorbida en partículas inertes de bentonita y cultivos de células Vero no fagocíticas y partículas de bentonita recubiertas de BSA, reveló que las células endocitaban las partículas de bentonita recubiertas de Masp52, mientras que las partículas de control recubiertas de BSA fueron eliminadas en lavados tras el proceso de interacción (Fig. 8). Las partículas de Masp 52 están localizadas dentro de vacuolas en el citoplasma de las células que han interactuado.

4. Efectos del suero frente a la Masp52 en la invasión celular por trypomastigotes metacíclicos

La Fig. 1 resume los resultados obtenidos tratando las interacciones célula-parásito con anticuerpos anti CR en diferentes diluciones (1:50; 1:100; 1:200) de inmunoglobulinas específicas. El porcentaje de inhibición frente al control osciló en un rango significativo que va desde un 17.14% para 1/200, 61.9% para 1/100 y 77.14% para 1/50 para parásitos intracelulares en células Vero. Los niveles de penetración se redujeron en un 30.7% para 1/200, 74.38% para 1/100 y 78.9% para 1/50, y el porcentaje de inhibición de trypomastigotes metacíclicos adheridos a células de 49.92% para 1/200, 74.35% para 1/100 y 74.48% para 1/50 dilution.

ES 2 343 236 B2

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de la presencia del parásito *T. cruzi* en un individuo, que comprende:
 - a. obtener una muestra biológica aislada de dicho individuo,
 - b. detectar la proteína Masp52 en la muestra biológica aislada de (a).
2. Método de detección de la presencia del parásito *T. cruzi* en un individuo según la reivindicación anterior, en el que el individuo del paso (a) es un mamífero.
3. Método de detección de la presencia del parásito *T. cruzi* en un individuo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el individuo del paso (a) es un mamífero humano.
4. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, que comprende:
 - a. obtener una muestra biológica aislada de un individuo,
 - b. detectar la cantidad de proteína Masp52 presente en la muestra biológica aislada de (a).
5. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas según la reivindicación anterior, que comprende además:
 - c. comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.
6. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en el que la detección de la cantidad de proteína Masp52 se realiza mediante la incubación con un anticuerpo específico en un inmunoensayo.
7. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el inmunoensayo es un *Western blot*.
8. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que el *Western blot* se lleva a cabo empleando IgG anti-CR.
9. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que el *Western blot* se lleva a cabo empleando IgG anti-SP.
10. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en el que la detección de la cantidad de proteína Masp52 se realiza mediante RTqPCR.
11. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas según la reivindicación anterior, donde la RTqPCR se lleva a cabo empleando los cebadores cuya secuencia se recoge en la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.
12. Uso de la proteína Masp52 aislada, o cualquiera de sus variantes, para la elaboración de un medicamento.
13. Uso de la proteína Masp52 aislada, o cualquiera de sus variantes, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas.
14. Anticuerpos generados por la inmunización de un animal con la proteína Masp52, o cualquiera de sus variantes.
15. Uso de los anticuerpos generados por la inmunización de un animal con la proteína Masp52 para la elaboración de un medicamento.
16. Uso de los anticuerpos generados por la inmunización de un animal con la proteína Masp52 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas.
17. Composición que comprende la proteína Masp52 según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.
18. Composición según la reivindicación 17, que además comprende excipientes farmacológicamente aceptables.

ES 2 343 236 B2

19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, que es una vacuna.

20. Composición según la reivindicación anterior, que además comprende un adyuvante.

5 21. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, donde donde la vacuna presenta un origen recombinante.

22. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, que adicionalmente comprende otro principio activo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

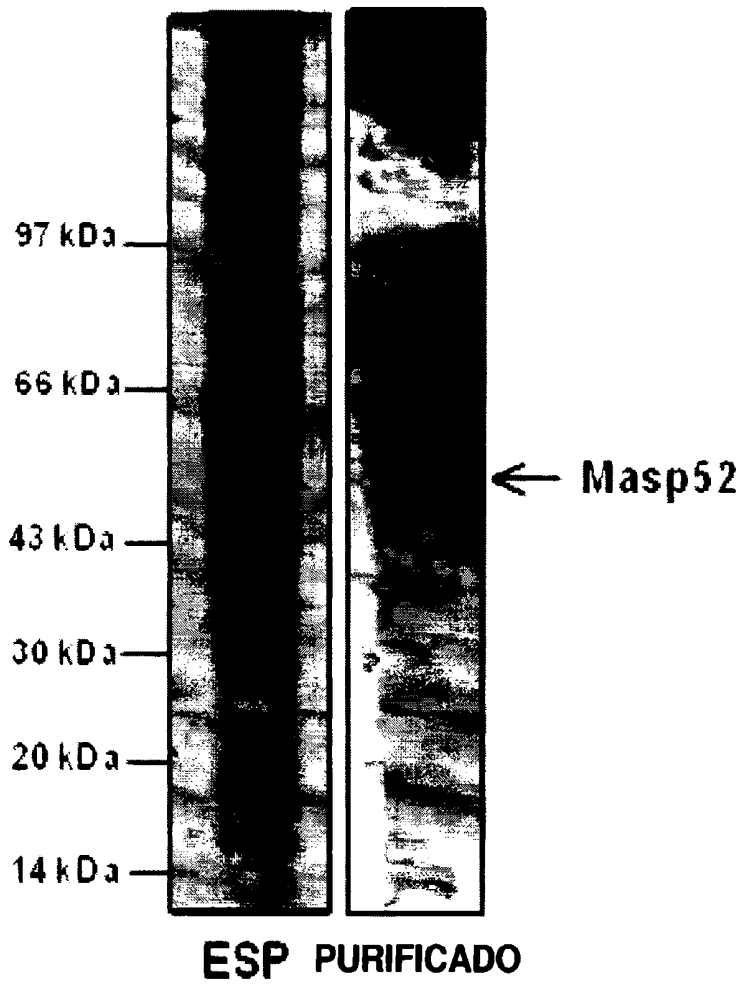


FIG. 1

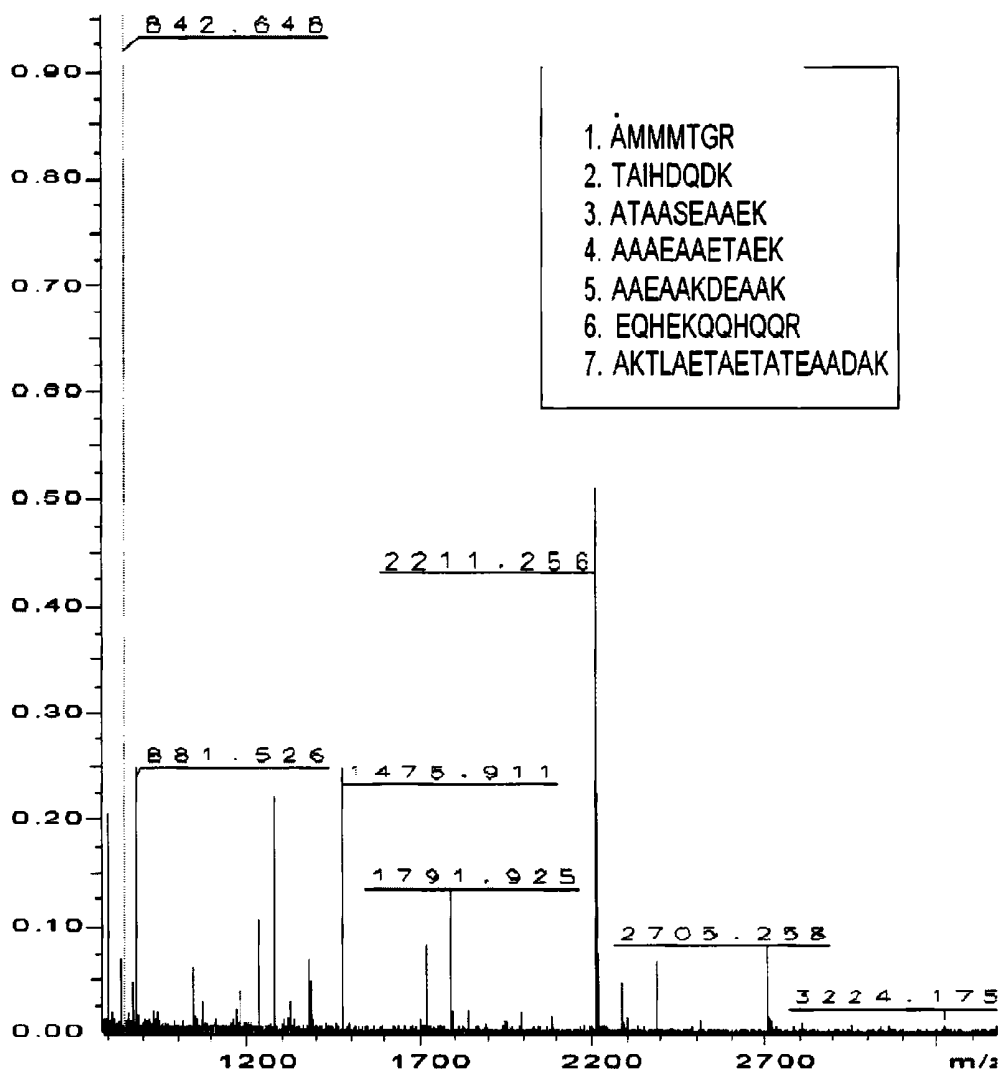


FIG. 2

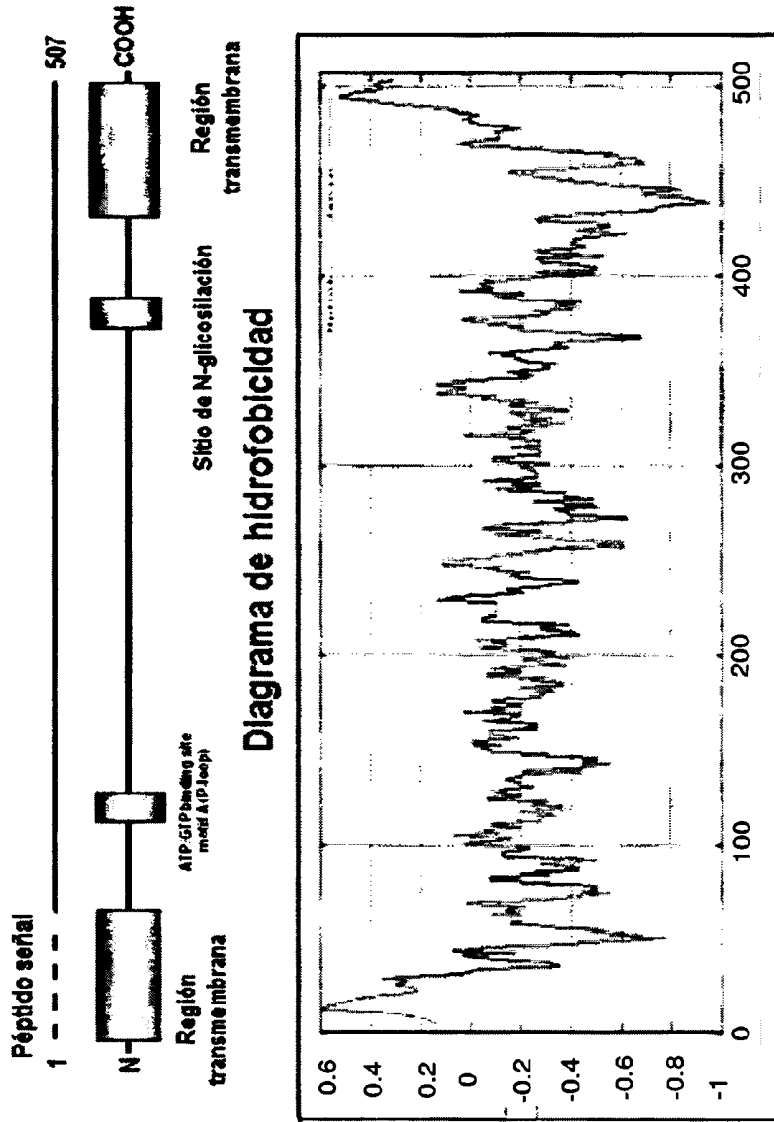


FIG. 3

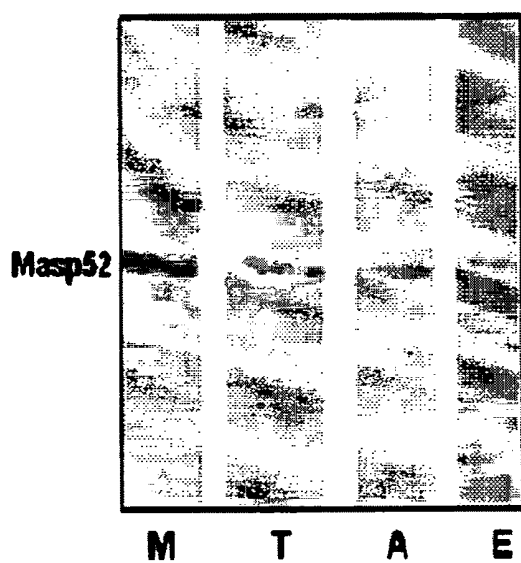


FIG. 4

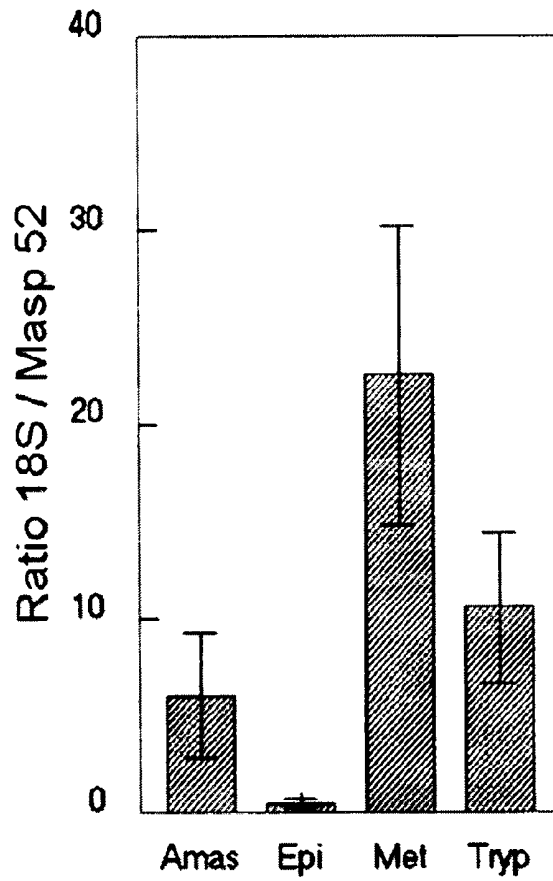


FIG. 5

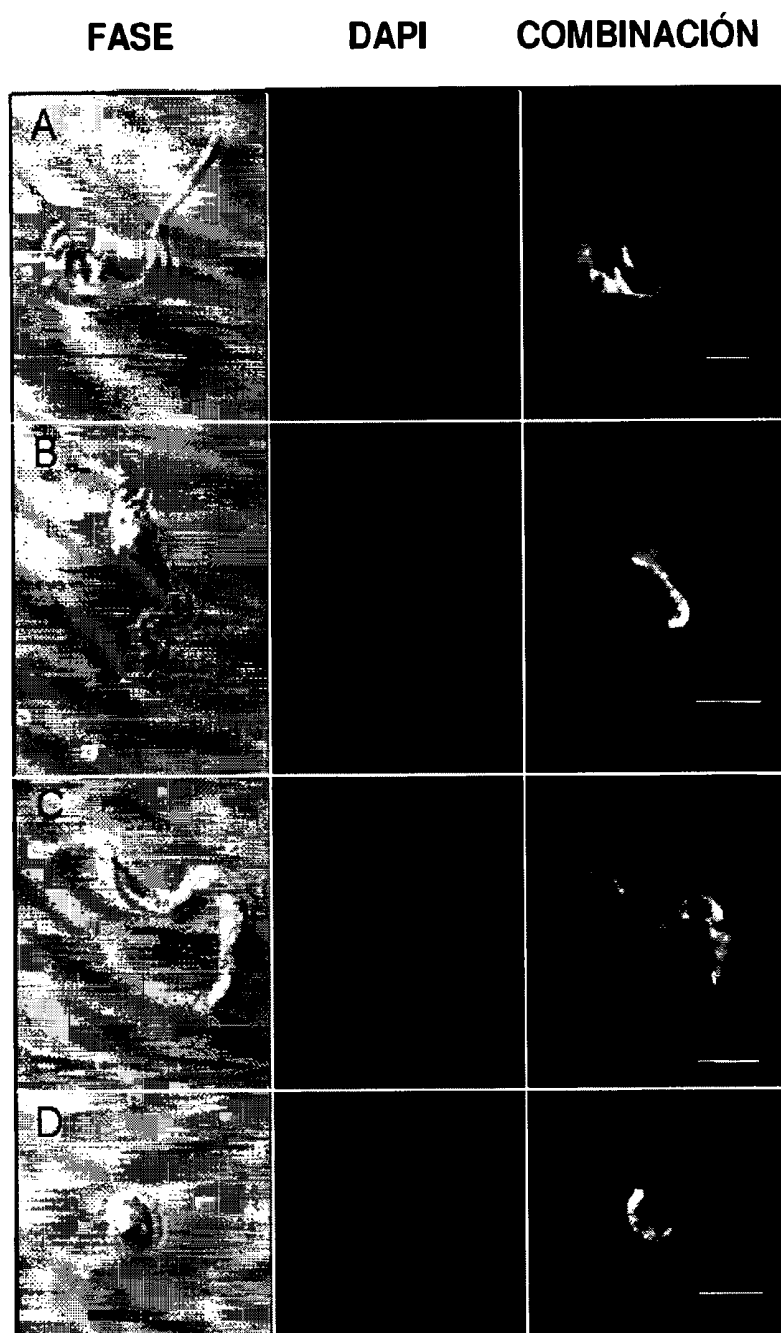


FIG. 6A

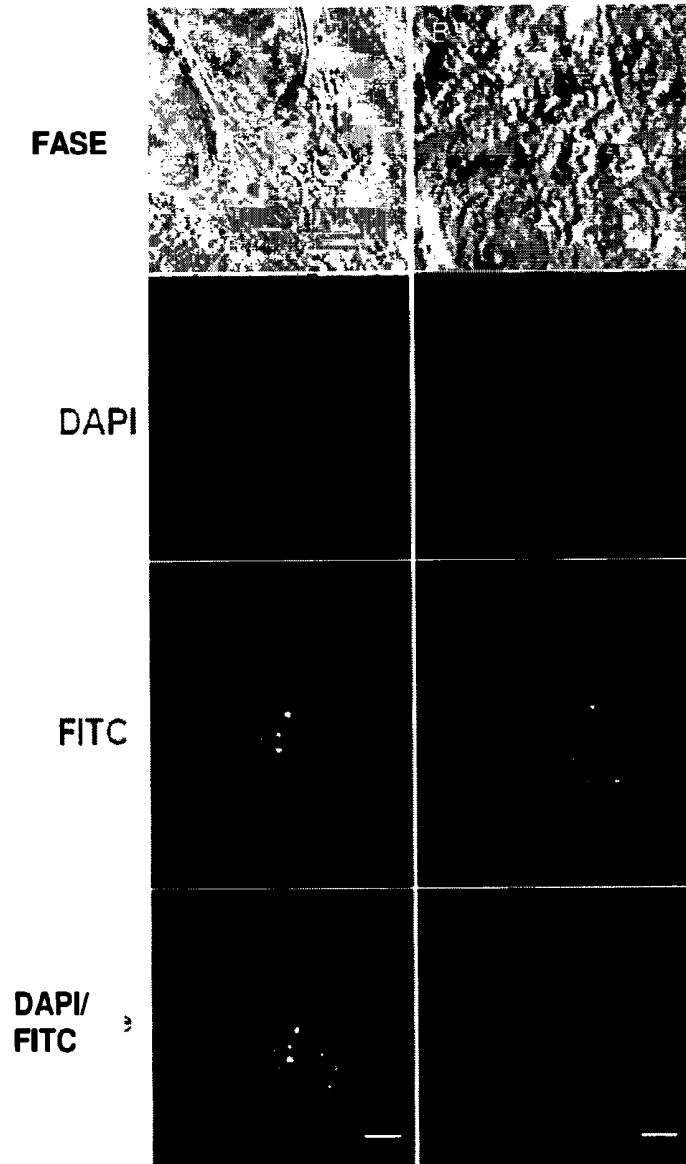


FIG. 6B

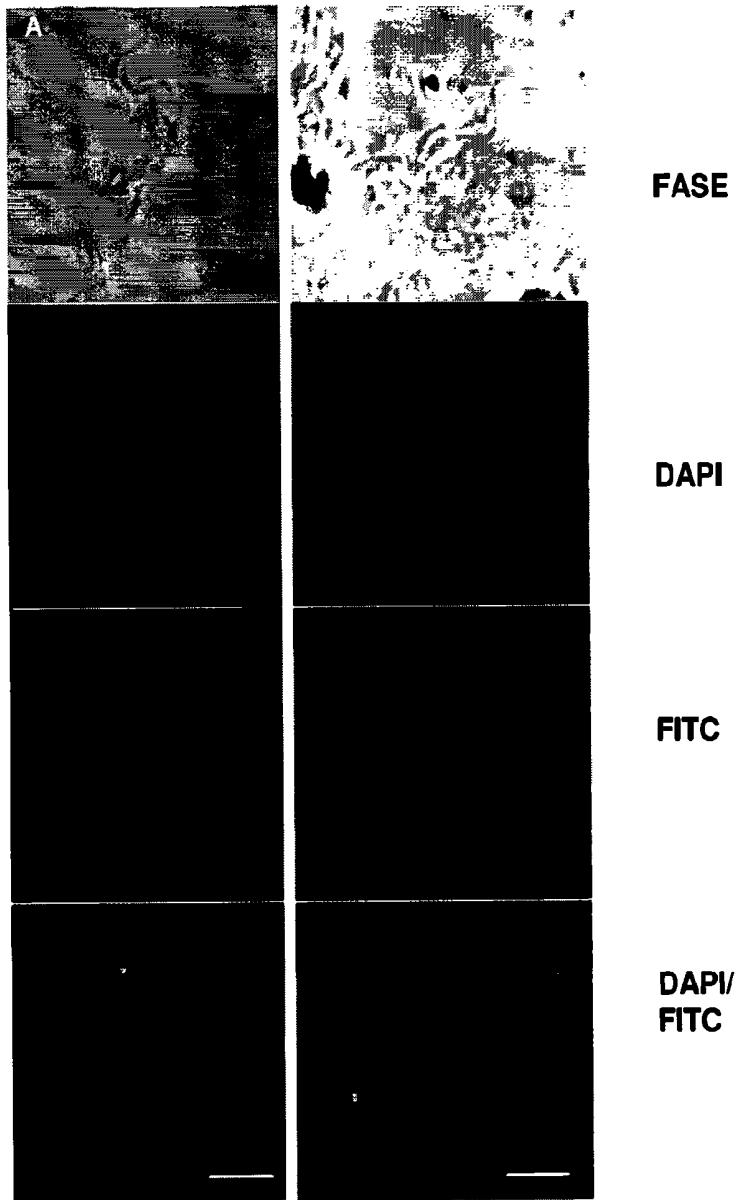


FIG. 6C



FIG. 7

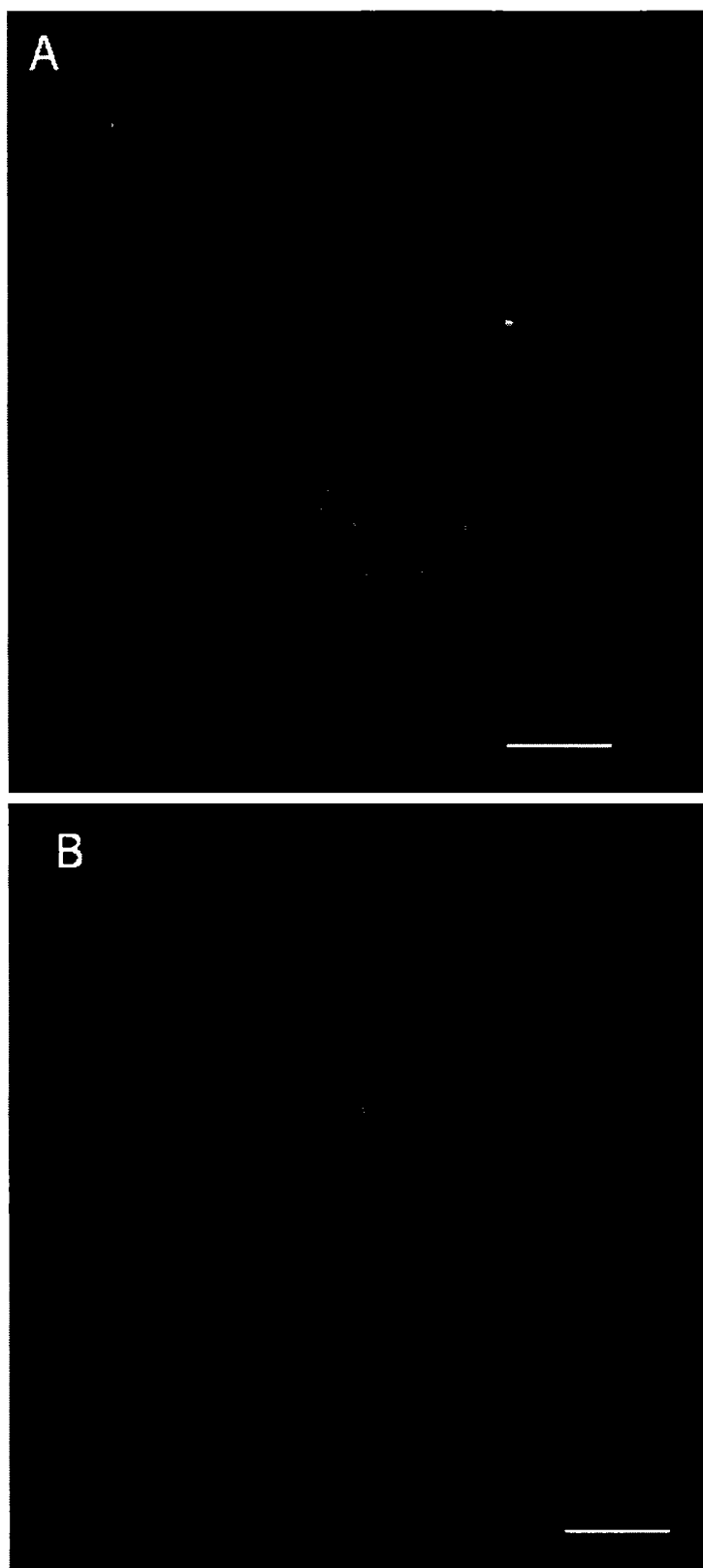


FIG. 8A y 8B

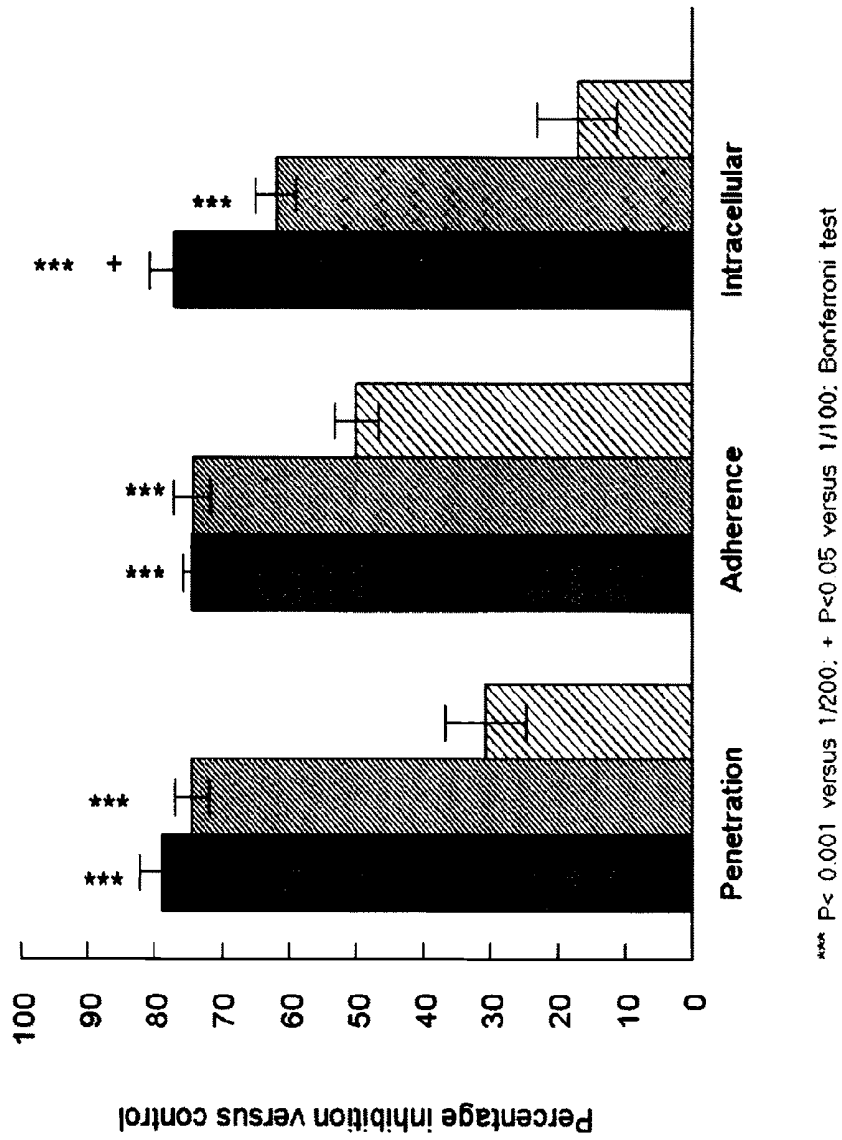


FIG. 9

ES 2 343 236 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Granada

5 <120> Uso de la proteína Masp 52 para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas.

<130> ES1634.23

10 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.4

15 <210> 1

<211> 507

<212> PRT

20 <213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 1

25 Met Ala Met Met Met Thr Gly Arg Val Leu Leu Val Cys Ala Leu Cys
 1 5 10 15
 Val Leu Trp Ser Val Ala Ala Asp Gly Ala Val Gly Val Val Ser Gly
 20 25 30
 30 Gly Asp Asp Asn Ser Leu Lys Glu Leu Phe Ile Pro Val Ala Arg Leu
 35 40 45
 Lys Val Arg Gln Glu Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr Ala Asp Ala Lys
 50 55 60
 Ala Ala Ala Glu Ala Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Lys Ala Glu Ala
 65 70 75 80
 40 Glu Ala Ala Ser Glu Ala Ala Glu Lys Ala Lys Ala Ala Ala Glu Glu
 85 90 95
 45 Ala Ala Val Lys Thr Thr Ala Ala Val Glu Ala Ser Ala Lys Ala Ala
 100 105 110
 Glu Ala Ala Ala Lys Ala Lys Thr Leu Ala Glu Thr Ala Glu Thr Ala
 115 120 125
 50 Thr Glu Ala Ala Asp Ala Lys Ala Ala Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala
 130 135 140
 55 Lys Ala Glu Ala Glu Ala Ala Ser Glu Ala Ala Ser Glu Ala Ala Glu
 145 150 155 160
 Glu Ala Ala Gly Lys Thr Thr Ala Ala Ala Glu Ala Ser Ala Lys Ala
 165 170 175
 60 Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala Lys Thr Leu Ala Glu Thr Ala Glu Thr
 180 185 190
 65 Ala Thr Glu Ala Ala Glu Lys Ala Ala Ala Lys Ala Thr Ala Ala Ser

ES 2 343 236 B2

	195		200				205									
5	Glu	Ala	Ala	Glu	Lys	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys
		210					215					220				
10	Thr	Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Lys	Thr	Ser	Ala	Glu
	225				230					235						240
15	Thr	Ala	Lys	Met	Ala	Thr	Ala	Asn	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala
				245						250					255	
20	Glu	Thr	Glu	Thr	Glu	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Glu	Ala	Thr	
				260						265			270			
25	Thr	Lys	Ala	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Asp	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala
			275				280					285				
30	Ala	Ala	Thr	Ala	Lys	Thr	Ala	Ala	Glu	Glu	Ala	Ser	Ala	Lys	Ala	Ala
		290					295					300				
35	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Glu	Thr	Ala
	305					310					315				320	
40	Lys	Ala	Ser	Ala	Gly	Lys	Ala	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala
				325						330					335	
45	Glu	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Lys	Thr	Ser
				340				345						350		
50	Ala	Glu	Thr	Ala	Asn	Thr	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Lys	Ala	Glu
			355				360						365			
55	Thr	Glu	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Glu	Ala	Asp	Ala	Lys	Thr	Thr
	370						375					380				
60	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Thr	Thr
	385					390					395				400	
65	Val	Arg	Glu	Glu	Glu	Val	Lys	Thr	Ala	Ile	His	Asp	Gln	Asp	Lys	Ser
				405						410					415	
70	Val	Glu	His	His	Ser	Glu	Glu	Lys	Gln	Glu	Leu	Leu	Gln	Glu	Glu	Gly
				420					425					430		
75	Thr	Glu	Arg	Gln	Glu	Lys	Glu	Gln	His	Glu	Lys	Gln	Gln	His	Gln	Gln
			435					440					445			
80	Arg	Glu	His	Ser	Ala	Gly	Asn	Gly	Glu	Glu	Ser	Pro	Lys	Glu	Lys	Thr
	450						455					460				
85	Ala	Asn	Gly	Thr	Asn	Ala	Thr	Ala	Ile	Thr	Asp	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
	465					470					475					480

ES 2 343 236 B2

Thr Ala Val Ser His Thr Thr Ser Pro Leu Leu Leu Leu Phe Phe Phe
 485 490 495

5 Ala Cys Ala Ala Thr Ala Val Val Ala Ala
 500 505

<210> 2

10 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

15 <220>

<223> cebador MASP.220F

<400> 2

20 ccagttgcga gattgaaggt

20

<210> 3

25 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

30 <220>

<223> cebador MASP.220R

<400> 3

35 tgcagatgct tcaactgctg

20

<210> 4

40 <211> 25

<212> PRT

<213> *Trypanosoma cruzi*

45 <400> 4

Met Ala Met Met Met Thr Gly Arg Val Leu Leu Val Cys Ala Leu Cys
 1 5 10 15

50 Val Leu Trp Ser Val Ala Ala Asp Gly
 20 25

<210> 5

55 <211> 8

<212> PRT

<213> *Trypanosoma cruzi*

60 <400> 5

Ala Glu Glu Ala Ala Gly Lys Thr
 1 5

65 <210> 6
 <211> 9

ES 2 343 236 B2

<212> PRT

<213> *Trypanosoma cruzi*

5 <400> 6

Ala Asn Gly Thr Asn Ala Thr Ala Ile
1 5

10 <210> 7

<211> 1524

<212> DNA

<213> *Trypanosoma cruzi*

15

<400> 7

	atggcgatga tgatgactgg ccgtgtgctg ctggtgtgtg ccctctgctg gctgtggtcc	60
20	gttgcggccg atggagctgt tgggtgtggtt tctggtgggg acgacaacag tctgaaagaa	120
	ttattttattc cagtttgcgag attgaaggtg agacaagaac aaagagcagc agaagcaaca	180
	gctgacgcaa aggcagcagc agaagcagca gaaacagcag aaaaggcaaa agcagaagca	240
25	gaagcagcat cagaagcagc tgaaaaagca aaagcagcag cggagaagc agcagtaaaa	300
	acaacagcag cagttgaagc atctgcaaaa gcggcagaag cagcagcaaa agcaaaaaca	360
30	ttagcagaaa cagcagaaac agcaacagaa gcagctgacg caaaggcagc agcagaaaca	420
	gcagaaaagg caaaagcaga agcagaagca gcatcagaag cagcatcaga agcagcggaa	480
	gaagcagcag gaaaaacaac agcagcagct gaagcatccg caaaagccgc agaagcagca	540
35	gcaaaagcaa aaacattagc agaaacagct gaaacagcaa cagaagcagc tgaaaaggca	600
	gcagcaaaaag caacggcagc atcagaagca gctgaaaaag caaaagcagc agcagcagag	660
40	gcggcagcaa aaacagcagc agcagaagca gcagcagcag aagcaaaaac atcagcagaa	720
	acagcaaaaa tggcaacagc aaacgcggca acagctgacg caaaagcaga aacagaaaca	780
	gaaaaagcag ccgcagcagc agcgaaagaa gcaaccacaa aagcgaaagc agcagaagca	840
45	gcaaaagatg aagcagcaaa agctgcagca acagcaaaaa cagcagcaga agaagcatct	900
	gcaaaagccg cagaagcagc agcaaaagca aaagctgacg ctgaagcagc tgaaacagca	960
	aaagcatcag caggaaaagc agcagaagaa gcagcaaaag cagcggcaga ggcagcagcc	1020
50	acagcagcag aagcggcagc agaagcaaaa acatcagcag aaacagcaaa cacggaaaca	1080
	gctgcagcaa aagcaaaaagc agaaacagaa aaagcagcag cagcagcaac ggaagcagac	1140
55	gcaaaaacaa cagcagcaaa gacagcagag gcagcagcag aagcactgcg aggtacgaca	1200
	gtccgagaag aggaggtaaa aacagcaata catgatcagg ataatcagt cgaacaccat	1260
	tctgaagaaa aacaagagct tctacaagaa gaaggaacgg aacgacaaga aaaagaacag	1320
60	catgaaaagc agcaacacca acagcgtgaa cattccgcag gaaatggcga agaatccccg	1380
	aaagaaaaaa ctgctaattg tacaatgca actgcaatta cggacgacag tgacggcagc	1440
	accgcggtct cccacaccac ctcccctctt ttgcttcttt ttttttttgc gtgtgctgct	1500
65	gctactgcgg tgggtgcccgc gtga	1524

ES 2 343 236 B2

<400> 10

5 Thr Ala Gly Thr Cys Ala Thr Ala Thr Gly Cys Thr Thr Gly Thr Thr
1 5 10 15
10 Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Thr Thr Ala Gly Cys Cys Ala Thr
20 25 30
15 Gly Cys Ala Thr Gly Cys Cys Thr Cys Ala Gly Ala Ala Thr Cys Ala
35 40 45
20 Cys Thr Gly Cys Ala Thr Thr Gly Cys Ala Gly Gly Ala Ala Thr Cys
50 55 60
25 Thr Gly Cys Gly Cys Ala Thr Gly Gly Cys Thr Cys Ala Thr Thr Ala
65 70 75 80
30 Cys Ala Thr Cys Ala Gly Ala Cys Gly Thr Ala Ala Thr Cys Thr Gly
85 90 95
35 Cys Cys Gly Cys Ala Ala Ala Ala Ala Thr Cys Thr Thr Gly Cys Gly
100 105 110
40 Gly Thr Cys Thr Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Ala Thr Thr Gly Gly
115 120 125
45 Ala Thr Ala Ala Cys Thr Thr Gly Gly Cys Gly Ala Ala Ala Cys Gly
130 135 140
50 Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Ala Ala Thr Ala Cys Ala Thr Gly Ala
145 150 155 160
55 Ala Cys Cys Ala Ala Cys Cys Gly Gly Ala Thr Gly Thr Thr Cys Thr
165 170 175
60 Cys Thr Gly Thr Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Gly
180 185 190
65

ES 2 343 236 B2

Gly Cys Ala Ala Cys Ala Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Ala
 195 200 205
 5
 Thr Gly Gly Gly Ala Cys Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Ala Ala
 210 215 220
 10
 Thr Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Ala Cys
 225 230 235 240
 15
 Cys Ala Ala Thr Gly Cys Cys Thr Thr Cys Ala Cys Cys Gly Gly Cys
 245 250 255
 20
 Ala Gly Thr Ala Ala Cys Ala Cys Thr Cys Ala Gly Ala Ala Gly Thr
 260 265 270
 25
 Gly Thr Thr Gly Ala Thr Thr Cys Ala Ala Thr Thr Cys Ala Thr Thr
 275 280 285
 30
 Cys Cys Gly Thr Gly Cys Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Gly Gly Gly
 290 300
 35
 Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Cys Cys Cys Gly Gly Cys Gly Thr Cys
 305 310 315 320
 40
 Thr Thr Thr Thr Gly Ala Cys Gly Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Gly
 325 330 335
 45
 Cys Cys Cys Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Cys Gly Ala
 340 345 350
 50
 Thr Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Gly Thr Gly Gly Ala Cys
 355 360 365
 55
 Thr Gly Cys Cys Ala Thr Gly Gly Cys Gly Thr Thr Gly Ala Cys Gly
 370 375 380
 60
 Gly Gly Ala Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ala Thr Thr Ala Gly Gly
 385 390 395 400
 65
 Gly Thr Thr Cys Gly Ala Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 405 410 415
 Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Ala Ala Thr Ala Gly
 420 425 430
 Cys Thr Ala Cys Cys Ala Cys Thr Thr Cys Thr Ala Cys Gly Gly Ala
 435 440 445
 Gly Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Gly Cys Ala
 450 455 460

ES 2 343 236 B2

Ala Ala Thr Thr Gly Cys Cys Cys Ala Ala Thr Gly Thr Cys Ala Ala
465 470 475 480

5 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Thr Gly Ala Gly Gly Cys
485 490 495

10 Ala Gly Cys Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Ala Gly Ala
500 505 510

15 Gly Cys Cys Gly Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Thr Thr Thr Thr Gly
515 520 525

20 Cys Ala Thr Thr Gly Thr Cys Gly Thr Thr Thr Thr Cys Ala Ala Thr
530 535 540

25 Gly Gly Gly Gly Gly Ala Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ala Ala Cys Cys
545 550 555 560

30 Cys Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Ala Thr Cys Gly Ala Gly Thr Ala
565 570 575

35 Ala Cys Ala Ala Thr Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly
580 585 590

40 Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Cys
595 600 605

45 Gly Cys Gly Gly Thr Ala Ala Thr Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr Cys
610 615 620

50 Cys Ala Ala Ala Ala Gly Cys Gly Thr Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala
625 630 635 640

55 Thr Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Thr Gly Thr Thr Ala Ala Ala
645 650 655

60 Gly Gly Gly Thr Thr Cys Gly Thr Ala Gly Thr Thr Gly Ala Ala Thr
660 665 670

65 Thr Gly Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Cys Thr Ala Ala Gly Gly Cys
675 680 685

70 Gly Cys Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Ala Gly Thr Cys Cys Cys
690 695 700

75 Ala Thr Cys Cys Ala Cys Thr Thr Cys Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly
705 710 715 720

80 Thr Gly Ala Cys Cys Cys Ala Thr Gly Cys Cys Cys Thr Thr Gly Thr
725 730 735

ES 2 343 236 B2

Gly Gly Thr Cys₇₄₀ Cys Gly Thr Gly Ala₇₄₅ Ala Cys Ala Gly Ala₇₅₀ Cys Ala
 5 Thr Thr Cys₇₅₅ Ala Gly Ala Ala Ala₇₆₀ Cys Ala Ala Ala₇₆₅ Ala Ala Ala Cys
 10 Ala Cys₇₇₀ Gly Gly Gly Ala Gly₇₇₅ Thr Gly Gly Thr Ala₇₈₀ Cys Cys Thr Thr
 15 Thr Thr Cys Thr Cys Thr₇₉₀ Gly Ala Thr Thr Ala₇₉₅ Thr Cys Gly Cys Ala₈₀₀
 Thr Gly Thr Cys Ala₈₀₅ Thr Gly Cys Ala Thr₈₁₀ Gly Cys Cys Ala Gly₈₁₅ Ala
 20 Gly Gly Gly Cys₈₂₀ Gly Cys Cys Cys Gly₈₂₅ Thr Gly Ala Thr Thr₈₃₀ Thr Thr
 25 Thr Thr Ala₈₃₅ Cys Thr Gly Thr Gly₈₄₀ Ala Cys Thr Ala Ala₈₄₅ Ala Ala Ala
 30 Ala Gly Thr Gly Thr Gly Ala₈₅₅ Cys Cys Ala Ala Ala₈₆₀ Gly Cys Ala Gly
 35 Thr Cys Ala Thr Thr Cys₈₇₀ Gly Ala Cys Thr Thr₈₇₅ Gly Ala Ala Thr Thr₈₈₀
 Ala Gly Ala Ala Ala₈₈₅ Gly Cys Ala Thr Gly₈₉₀ Gly Gly Ala Thr Ala₈₉₅ Ala
 40 Cys Ala Ala Ala₉₀₀ Gly Gly Ala Gly Cys₉₀₅ Ala Gly Cys Cys Thr₉₁₀ Cys Thr
 45 Gly Gly Gly₉₁₅ Cys Cys Ala Cys Cys₉₂₀ Gly Thr Thr Thr Cys₉₂₅ Gly Gly Cys
 50 Thr Thr Thr Thr Gly Thr Thr₉₃₅ Gly Gly Thr Thr Thr₉₄₀ Thr Ala Ala Ala
 Ala Gly Thr Cys Cys Ala Thr Thr Gly Gly Ala₉₅₅ Gly Ala Thr Thr Ala₉₆₀
 55 Thr Gly Gly Gly Gly₉₆₅ Cys Ala Gly Thr Gly₉₇₀ Thr Gly Ala Cys Ala₉₇₅ Ala
 60 Gly Cys Gly Gly₉₈₀ Cys Thr Gly Gly Gly₉₈₅ Thr Gly Gly Thr Thr₉₉₀ Ala Thr
 65 Thr Cys Cys₉₉₅ Ala Cys Ala Cys Ala₁₀₀₀ Cys Ala Thr Ala Cys₁₀₀₅ Ala Cys Ala
 Cys Thr Cys Cys Cys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Gly

ES 2 343 236 B2

	1010		1015		1020										
5	Gly	Ala	Cys	Gly	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr
	1025						1030					1035			
10	Gly	Thr	Gly	Thr	Gly	Gly	Cys	Ala	Cys	Thr	Cys	Gly	Thr	Cys	Gly
	1040						1045					1050			
15	Cys	Cys	Thr	Thr	Thr	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Cys
	1055						1060					1065			
20	Cys	Gly	Thr	Gly	Thr	Gly	Gly	Cys	Ala	Cys	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr
	1070						1075					1080			
25	Gly	Thr	Gly	Thr	Thr	Gly	Thr	Thr	Gly	Gly	Cys	Ala	Gly	Ala	Cys
	1085						1090					1095			
30	Thr	Thr	Cys	Gly	Gly	Thr	Cys	Thr	Thr	Ala	Cys	Cys	Cys	Thr	Thr
	1100						1105					1110			
35	Cys	Gly	Cys	Ala	Thr	Cys	Thr	Cys	Ala	Cys	Ala	Thr	Gly	Thr	Gly
	1115						1120					1125			
40	Thr	Cys	Ala	Thr	Gly	Cys	Cys	Thr	Thr	Cys	Cys	Cys	Thr	Cys	Ala
	1130						1135					1140			
45	Ala	Cys	Thr	Cys	Ala	Cys	Gly	Gly	Cys	Ala	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly
	1145						1150					1155			
50	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Thr	Ala
	1160						1165					1170			
55	Gly	Thr	Thr	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Cys	Gly
	1175						1180					1185			
60	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Cys	Gly	Thr	Cys	Ala	Gly	Ala
	1190						1195					1200			
65	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	Cys	Thr	Thr	Ala	Gly	Ala
	1205						1210					1215			
70	Cys	Cys	Gly	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Ala	Gly	Ala	Cys	Gly	Ala	Ala
	1220						1225					1230			
75	Cys	Thr	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Cys	Ala	Thr
	1235						1240					1245			
80	Thr	Cys	Thr	Thr	Cys	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Ala	Cys	Cys	Thr
	1250						1255					1260			
85	Thr	Cys	Cys	Thr	Cys	Ala	Ala	Thr	Cys	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Cys
	1265						1270					1275			

ES 2 343 236 B2

Cys Ala Ala Ala Gly Thr Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ala Thr Cys
 1280 1285 1290
 5
 Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Ala Thr Thr Ala Gly Ala Gly Ala
 1295 1300 1305
 10
 Cys Cys Ala Thr Thr Gly Thr Ala Gly Thr Cys Cys Ala Cys Ala
 1310 1315 1320
 15
 Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Cys Gly Ala Thr Gly Ala Cys Ala
 1325 1330 1335
 20
 Cys Cys Cys Ala Thr Gly Ala Ala Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ala
 1340 1345 1350
 25
 Gly Thr Thr Thr Thr Thr Gly Gly Thr Cys Gly Thr Ala Gly Gly
 1355 1360 1365
 30
 Cys Gly Thr Gly Gly Thr Cys Gly Gly Gly Thr Thr Thr Gly Ala
 1370 1375 1380
 35
 Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Cys Ala Thr Cys
 1385 1390 1395
 40
 Cys Cys Gly Thr Thr Cys Cys Thr Cys Gly Thr Cys Thr Cys Gly
 1400 1405 1410
 45
 Cys Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala Ala
 1415 1420 1425
 50
 Ala Thr Thr Thr Ala Cys Gly Thr Gly Cys Ala Thr Ala Thr Thr
 1430 1435 1440
 55
 Cys Thr Thr Thr Thr Thr Gly Gly Thr Cys Cys Thr Cys Gly Thr
 1445 1450 1455
 60
 Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly Ala Gly Gly
 1460 1465 1470
 65
 Gly Cys Cys Thr Thr Thr Ala Ala Cys Gly Gly Gly Ala Ala Thr
 1475 1480 1485
 Ala Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Cys Gly Thr Thr Ala
 1490 1495 1500
 Thr Cys Thr Gly Ala Cys Thr Thr Cys Thr Thr Cys Ala Cys Gly
 1505 1510 1515
 Cys Gly Ala Ala Ala Gly Cys Thr Thr Thr Gly Ala Gly Gly Thr
 1520 1525 1530

ES 2 343 236 B2

Thr Ala Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Ala Gly Gly Gly Gly Gly
 1535 1540 1545
 5 Gly Ala Gly Thr Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Cys Ala Ala Gly
 1550 1555 1560
 10 Ala Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala
 1565 1570 1575
 15 Ala Ala Thr Thr Gly Ala Cys Gly Gly Ala Ala Thr Gly Gly Cys
 1580 1585 1590
 20 Ala Cys Cys Ala Cys Ala Ala Gly Ala Cys Gly Thr Gly Gly Ala
 1595 1600 1605
 25 Gly Cys Gly Thr Gly Cys Gly Gly Thr Thr Thr Ala Ala Thr Thr
 1610 1615 1620
 30 Thr Gly Ala Cys Thr Cys Ala Ala Cys Ala Cys Gly Gly Gly Gly
 1625 1630 1635
 35 Ala Ala Cys Thr Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly Ala Thr Cys Cys
 1640 1645 1650
 40 Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Gly Ala Gly Gly Ala Thr
 1655 1660 1665
 45 Thr Gly Ala Cys Ala Gly Ala Thr Thr Gly Ala Gly Thr Gly Thr
 1670 1675 1680
 50 Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Gly Ala Thr Cys Cys Cys Cys
 1685 1690 1695
 55 Thr Gly Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Cys Ala Thr
 1700 1705 1710
 60 Gly Gly Cys Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Gly Gly Thr Cys Gly
 1715 1720 1725
 65 Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Ala Thr Thr Thr Gly Thr Thr
 1730 1735 1740
 Thr Gly Gly Thr Thr Gly Ala Thr Thr Cys Cys Gly Thr Cys Ala
 1745 1750 1755
 Ala Cys Gly Gly Ala Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Ala Ala
 1760 1765 1770
 Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys Ala Gly Thr Ala Gly Gly Ala Thr
 1775 1780 1785

ES 2 343 236 B2

Thr Cys Ala Gly Ala Ala Thr Thr Gly Cys Cys Cys Ala Thr Ala
 1790 1795 1800
 5 Gly Gly Ala Thr Ala Gly Cys Ala Ala Thr Cys Cys Cys Thr Thr
 1805 1810 1815
 10 Cys Cys Gly Cys Gly Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Cys Cys Ala
 1820 1825 1830
 15 Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Thr Ala Thr Thr
 1835 1840 1845
 20 Cys Gly Cys Thr Thr Gly Thr Ala Thr Cys Cys Thr Thr Cys Thr
 1850 1855 1860
 25 Cys Thr Gly Cys Gly Gly Gly Ala Thr Thr Cys Cys Thr Thr Gly
 1865 1870 1875
 30 Thr Thr Thr Thr Gly Cys Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala
 1880 1885 1890
 35 Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Gly Gly Cys Ala Ala Cys Ala Gly
 1895 1900 1905
 40 Cys Ala Gly Gly Thr Cys Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Cys Thr
 1910 1915 1920
 45 Cys Cys Thr Cys Ala Ala Thr Gly Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly
 1925 1930 1935
 50 Cys Gly Ala Cys Ala Cys Gly Cys Gly Cys Ala Cys Thr Ala Cys
 1940 1945 1950
 55 Ala Ala Thr Gly Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Gly Ala Ala Cys
 1955 1960 1965
 60 Ala Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Cys Gly Ala Cys Thr Cys Thr
 1970 1975 1980
 65 Thr Gly Thr Cys Gly Gly Ala Cys Cys Thr Ala Cys Thr Thr Gly
 1985 1990 1995
 Ala Thr Cys Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Ala
 2000 2005 2010
 Ala Ala Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Ala Thr Cys Ala Cys
 2015 2020 2025
 Gly Thr Ala Gly Ala Cys Cys Cys Ala Cys Thr Thr Gly Gly Gly
 2030 2035 2040
 Ala Cys Cys Gly Ala Gly Thr Ala Thr Thr Gly Cys Ala Ala Thr

ES 2 343 236 B2

	2045					2050						2055			
5	Thr	Ala	Thr	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys	Gly	Cys	Gly	Cys	Ala	Ala	Cys
		2060					2065					2070			
10	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly	Thr	Cys	Thr	Cys	Gly	Thr	Ala
		2075					2080					2085			
15	Gly	Gly	Cys	Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Thr	Cys	Ala	Thr	Cys	Ala	Ala
		2090					2095					2100			
20	Ala	Cys	Thr	Gly	Thr	Gly	Cys	Cys	Gly	Ala	Thr	Thr	Ala	Cys	Gly
		2105					2110					2115			
25	Thr	Cys	Cys	Cys	Thr	Gly	Cys	Cys	Ala	Thr	Thr	Thr	Gly	Thr	Ala
		2120					2125					2130			
30	Cys	Ala	Cys	Ala	Cys	Cys	Gly	Cys	Cys	Cys	Gly	Thr	Cys	Gly	Thr
		2135					2140					2145			
35	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Cys	Cys	Gly	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	Gly
		2150					2155					2160			
40	Thr	Gly	Cys	Ala	Ala	Thr	Ala	Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Thr
		2165					2170					2175			
45	Cys	Gly	Gly	Ala	Cys	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Cys
		2180					2185					2190			
50	Thr	Thr	Cys	Ala	Cys	Thr	Thr	Gly	Ala	Cys	Cys	Gly	Ala	Ala	Ala
		2195					2200					2205			
55	Gly	Thr	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Gly	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Thr	Cys
		2210					2215					2220			
60	Thr	Thr	Cys	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Cys
		2225					2230					2235			
65	Ala	Ala													
		2240													



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 343 236

② Nº de solicitud: 200901403

③ Fecha de presentación de la solicitud: **03.06.2009**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DANIELLA C. BARTHOLOMEU et al. "Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen Trypanosoma cruzi" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 37, no. 10, 31.03.2009, páginas 3407-3417. Resumen y página 3409: results.	1-22
A	VALERIA TEKIEL et al. "Identification of novel vaccine candidates for Chagas' disease by immunization with sequential fractions of a trypomastigote cDNA expression library" VACCINE, vol 27, 20.01.2009, páginas 1323-1332. Páginas 1330-1331.	1-22
A	TERESA ABATEL et al. "A mucin like gene different from the previously reported members of the mucin like gene families is transcribed in Trypanosoma cruzi but not in Trypanosoma rangeli" MEM INST OSWALDO CRUZ, vol. 100 (4), julio 2005, páginas 391-395. Páginas 391 y 395.	1-22
A	US 4870006 A (DRAGON et al.) 26.09.1989, reivindicación 1.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

08.07.2010

Examinador

S. González Peñalba

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/44 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

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

C07K, C12Q, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, XPESP, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.07.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-22	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-22	SÍ
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen <i>Trypanosoma cruzi</i>	31-03-2009
D02	Identification of novel vaccine candidates for Chagas' disease by immunization with sequential fractions of a trypomastigote cDNA expression library	20-01-2009
D03	A mucin like gene different from the previously reported members of the mucin like gene families is transcribed in <i>Trypanosoma cruzi</i> but not in <i>Trypanosoma rangeli</i>	2005
D04	US 4870006 A	26-09-1989

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

La presente solicitud de patente, tal y como ha sido redactada, hace referencia a un método de detección de la presencia del parásito *Trypanosoma cruzi* en un individuo, que comprende: obtener una muestra biológica aislada de dicho individuo y detectar la proteína Masp52 en dicha muestra biológica (reivindicación 1). Según la invención el individuo es un mamífero, concretamente un mamífero humano (reivindicaciones 2 y 3). Dicha solicitud se refiere también a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (reivindicaciones 4 y 5) en el que la detección de la cantidad de proteína Masp52 se realiza mediante incubación con un anticuerpo específico en un inmunoensayo concretamente en un Western blot que se lleva a cabo empleando IgG anti-CR o IgG anti-SP (reivindicaciones 6-9). También la detección de la cantidad de proteína Masp52 se realiza mediante RTqPCR empleando los cebadores SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3 (reivindicaciones 10 y 11). Se quiere proteger también el uso de la proteína Masp52 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas (reivindicaciones 12 y 13), los anticuerpos generados por la inmunización de un animal con la proteína Masp52 (reivindicación 14), el uso de los anticuerpos para la elaboración de un medicamento (reivindicaciones 15 y 16) y la composición que comprende la proteína Masp52 o un anticuerpo (reivindicaciones 17-22).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA: ARTS 6 Y 8 DE LA LP

El documento D01 hace referencia a una nueva familia de multigenes que se ha identificado recientemente en *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas, que codifican proteínas superficiales asociadas a mucina (MASPs: mucin-associated surface proteins) (véase resumen y página 3409, apartado: results).

El documento D02 se refiere a la identificación de nuevos candidatos para vacunas contra la enfermedad de Chagas mediante la inmunización con fracciones secuenciales de una librería de expresión de cDNA de trypomastigote. Se utiliza el trypomastigote porque es el estado del parásito que expresa genes que permiten al parásito diseminarse en los tejidos y en las células invadidas (resumen). El método trata de, mediante inmunización genética (librería de cDNA de trypomastigote), permitir al sistema inmunológico del huésped seleccionar los antígenos más protectores (páginas 1330-1331).

El documento D03 describe un gen que codifica para una glicoproteína semejante a la mucina (mucin like gen) que es diferente de la familia de genes que codifican glicoproteínas semejantes a mucina, que se transcribe en *Trypanosoma cruzi* pero no en *Trypanosoma rangeli*. Este documento puede contribuir a un desarrollo potencial de un método de diagnóstico diferencial para la enfermedad de Chagas en países donde existe una co-infección de *Trypanosoma cruzi* con *Trypanosoma rangeli* (páginas 391 y 395).

El documento D04 trata sobre un material antigénico purificado para la detección de la enfermedad de Chagas que comprende un polipéptido (secuencia Figura 4) o su derivado que tiene un peso molecular de aproximadamente 70 Kd.

Hoja adicional

Ninguno de los documentos considerados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-22. además en los documentos citados no existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-22 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con la LP, arts 6 y 8.