

ANTÍGENOS QUIMÉRICOS IBMP 8.1 Y 8.3 MODIFICADOS PARA LA DETECCIÓN Y EL DIAGNÓSTICO DE TRYPANOSOMA CRUZI

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. Ser. No. 63/463,649, presentada el 3 de mayo de 2023, cuya divulgación se incorpora por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 La materia actualmente divulgada se refiere en general al uso de un antígeno IBMP quimérico modificado en la detección del parásito *Trypanosoma cruzi*, y más particularmente a la preparación y uso de antígenos IBMP quiméricos modificados 8.1 y 8.3 para detectar la presencia de *Trypanosoma cruzi* y diagnosticar una infección de la enfermedad de Chagas en sujetos humanos y animales. Los antígenos quiméricos IBMP 8.1 y 8.3 modificados de la divulgación se modifican mediante la adición o inserción del péptido PEP2 en los mismos, y
15 el antígeno PEP2 puede agregarse junto con otros antígenos o fragmentos adecuados de *T. cruzi*, y estos antígenos quiméricos modificados pueden usarse en inmunoensayos tales como un ensayo de flujo lateral para proporcionar un método altamente preciso de detección de anticuerpos de *T. cruzi* en sujetos humanos o animales y para diagnosticar una infección por la enfermedad de Chagas en tales sujetos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Entre varias enfermedades comunes a mascotas tal como los perros que también pueden afectar a los humanos, la tripanosomiasis americana, comúnmente conocida como enfermedad de Chagas, es una afección parasitaria causada por el protozoo hemoflagelado, *Trypanosoma cruzi*. La transmisión activa se produce a través de vectores triatomíneos
25 conocidos como chinches besuconas, las cuales son frecuentes en Norteamérica y Sudamérica. La defecación de los insectos infectados durante o después de alimentarse de sangre hace que los tripomastigotes infecciosos pasen a la herida de la picadura. Otras vías de infección son la transmisión transplacentaria a la descendencia de mujeres embarazadas infectadas y de animales preñados infectados y el consumo de diversos alimentos infectados,
30 como zumos y carnes contaminados con heces de triatomíneos. Otra fuente de estas

enfermedades son las transfusiones de sangre de otros pacientes que no han sido sometidos a pruebas de detección de tales parásitos. Después de que los tripomastigotes entran en la circulación, hay un breve periodo de replicación y propagación hematógena a través de células mononucleares, cuyo destino final son varios tejidos del huésped, incluidos el corazón, la grasa y el sistema linfático, donde residen y se multiplican como amastigotes intracelulares. Un siglo después de su descubrimiento, la infección por *T. cruzi* sigue siendo un grave problema sanitario en humanos y animales. Es una de las principales causas de cardiomiopatía que afecta a más de 8 millones de personas en todo el mundo, y se prevé que la enfermedad de Chagas cause por lo menos 200,000 muertes humanas en todo el mundo en los próximos 5 años, cifra idéntica al número de mujeres que se prevé que mueran de cáncer de mama en Estados Unidos en el mismo periodo de tiempo.

Mientras que la mayor prevalencia de cardiomiopatía debida a la enfermedad de Chagas en personas se encuentra en países de Centroamérica y Sudamérica, los estudios muestran una amplia distribución de tripanosomiasis americana en perros en Texas, Luisiana y Georgia e indican que estos estados del sur son los lugares de importantes reservorios para la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en los Estados Unidos. Se ha informado de que la prevalencia de la infección por *T. cruzi* en perros vagabundos y alojados en refugios es de entre el 7.5 % y el 8.8% y puede superar el 50 % en algunas perreras de perros de trabajo de Texas. El patrón de progresión de la enfermedad en perros con tripanosomiasis americana es similar al de las personas, el cual comprende fases aguda, crónica asintomática y crónica sintomática.

La enfermedad aguda se produce en las 3 semanas siguientes a la inoculación y se centra en la miocarditis con inflamación grave tras la muerte de las células cardíacas.^{16,17} La mayoría de los perros afectados tienen < 1 año, y los signos clínicos suelen incluir taquiarritmias, dificultad respiratoria, linfadenopatía, anorexia, diarrea, anomalías neurológicas, edema periférico, colapso y muerte súbita. La parasitemia es profunda y la tasa de mortalidad es alta, especialmente entre los perros < 1 año.

Desafortunadamente, la detección y el tratamiento de las enfermedades de Chagas siguen siendo limitados debido a las barreras y deficiencias de las pruebas de diagnóstico actuales. En particular, el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en medicina veterinaria se limita actualmente, desde el punto de vista comercial, a la detección de anticuerpos mediante IFI. Se trata de una tecnología antigua que utiliza el antígeno epimastigote completo del vector. Aunque esto es útil para diagnosticar anticuerpos en el paciente, se presta a falsos

negativos debido a la variación del antígeno en los múltiples tipos de cepas existentes en el mundo. No existe una prueba de referencia para detectar infecciones por *T. cruzi* en perros, y la IFA es la única prueba aprobada para el diagnóstico veterinario de Chagas. La bibliografía actual en donde se evalúan los intentos en este campo sigue haciéndose eco de la necesidad de disponer de pruebas más sensibles de la enfermedad de Chagas que sean precisas y eviten los falsos positivos que pueden producirse debido a la reactividad cruzada de muchos antígenos de *T. cruzi*.

En pruebas más recientes, algunos en el campo se centraron en antígenos quiméricos derivados de péptidos de *T. cruzi*, incluidos epítomos repetitivos como LA204, IBMP 8.1 e IBMP 8.4.. Aunque se consideró que algunos de estos antígenos quiméricos eran prometedores en la detección de anticuerpos de *T. cruzi*, las pruebas no eran coherentes, y en ciertas pruebas, el antígeno IBMP 8.3 fue el menos adecuado en términos de proporcionar resultados precisos con respecto a la identificación de infecciones por *T. cruzi* sin dar también positivo en otras posibles infecciones parasitarias.

Debido a la falta de pruebas precisas adecuadas, la infección por Chagas en perros suele pasarse por alto en medicina veterinaria y, a pesar de una gran prevalencia en EE. UU., actualmente no existe un protocolo de pruebas definitivo que pueda llevarse a cabo de forma eficiente y que, a la vez, tenga la alta precisión necesaria para lograr una prueba satisfactoria que no sufra de falsos positivos.

Por lo tanto, existe una necesidad desesperada de una prueba conveniente y sensible para las poblaciones de mascotas sintomáticas y asintomáticas para la enfermedad de Chagas que pueda proporcionar resultados altamente precisos y evitar falsos positivos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un antígeno quimérico IBMP modificado para su uso en la detección del parásito *Trypanosoma cruzi* en sujetos humanos y animales con mayor precisión y menos pruebas de falsos positivos. En este antígeno quimérico IBMP modificado, los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 se modifican para su uso en la detección de la presencia de *Trypanosoma cruzi* con el fin de diagnosticar la enfermedad de Chagas en un paciente humano o animal, y la modificación puede obtenerse insertando el péptido PEP2 y opcionalmente otros antígenos *T. cruzi* en los antígenos IBMP 8.1 y/o 8.3, y utilizando los anticuerpos modificados para detectar la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en pacientes humanos y animales. Se utiliza un antígeno IBMP 8.4 junto con los antígenos 8.1 y 8.3

modificados. Los antígenos quiméricos modificados que incluyen los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados junto con IBMP 8.4 pueden utilizarse en un ensayo de flujo lateral u otros ensayos adecuados para la detección de *T. cruzi* y el diagnóstico en un paciente humano o animal de una infección por la enfermedad de Chagas. Los kits de prueba que emplean estos antígenos quiméricos también se proporcionan como se describe más adelante.

En un aspecto de ejemplo de la presente invención se proporciona un antígeno quimérico el cual comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y/o un antígeno IBMP 8.3 modificado, en donde cualquiera de los dos antígenos IBMP 8.1 y/o 8.3 modificados contienen por lo menos un antígeno PEP2 insertado en el mismo. El PEP2 puede insertarse en los antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y/o 8.3 en cualquier lugar adecuado donde complemente el efecto antigénico de la proteína IBMP y proporcione una prueba más precisa y sensible para detectar la presencia de antígenos de *T. cruzi* en pacientes humanos y animales. Las inserciones de PEP2 pueden estar en una variedad de ubicaciones, como en muchas de las regiones específicas de los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 descritas en el presente documento. A continuación se proporcionan ejemplos específicos en donde el antígeno IBMP 8.1 modificado tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 2, y se proporcionan otros ejemplos adecuados en donde el antígeno IBMP 8.3 modificado de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6. También son posibles otras formas adecuadas de inserción de PEP2 dentro de la presente invención, como comprenderían las personas normalmente versadas en la técnica. En estas modalidades, los antígenos 8.1 y 8.3 IBMP modificados pueden contener un antígeno PEP2 o una pluralidad de antígenos PEP2 según sea necesario para maximizar la utilidad de estos antígenos en la formación de un ensayo de prueba eficiente y altamente preciso para anticuerpos de *T. cruzi* e infecciones de la enfermedad de Chagas en pacientes humanos y animales.

En otra modalidad de ejemplo, se proporciona un antígeno quimérico para diagnosticar una infección de la enfermedad de Chagas, en donde el antígeno quimérico comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y un antígeno IBMP 8.3 modificado, en donde los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados contienen por lo menos un antígeno PEP2. Como se indica más adelante, en la composición antigénica de la invención, esta construcción también puede incluir un antígeno IBMP 8.4 no modificado en combinación con los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados como se describe en el presente documento.

En otras modalidades de ejemplo, se proporciona un antígeno quimérico para

diagnosticar una infección de la enfermedad de Chagas, en donde el antígeno quimérico comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y un antígeno IBMP 8.3 no modificado, en donde el antígeno quimérico IBMP 8.1 modificado contiene por lo menos un antígeno PEP2. Además, se proporciona un antígeno quimérico para diagnosticar una infección de la enfermedad de Chagas, en donde el antígeno quimérico comprende un antígeno IBMP 8.3 modificado y un antígeno IBMP 8.1 no modificado, en donde el antígeno quimérico IBMP 8.3 modificado contiene por lo menos un antígeno PEP2. Como se indica más adelante, en las composiciones antigénicas de la invención, esta construcción también puede incluir un antígeno IBMP 8.4 no modificado en combinación con los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados como se describe en el presente documento.

En una modalidad de ejemplo adicional de la presente invención, se proporciona un antígeno quimérico para su uso en el diagnóstico de una infección de la enfermedad de Chagas que comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y/o un antígeno IBMP 8.3 modificado, y los antígenos 8.1 y/o 8.3 modificados incluyen por lo menos un antígeno PEP2 como se ha expuesto anteriormente y también pueden combinarse con un antígeno IBMP 8.4 no modificado. En determinadas modalidades, el antígeno IBMP 8.4 tendrá la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

En otra modalidad de ejemplo, puede proporcionarse el antígeno quimérico de la invención para su uso en el diagnóstico de una infección de la enfermedad de Chagas el cual comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y un antígeno IBMP 8.3 modificado, en donde los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados contienen por lo menos un antígeno PEP2 y un segundo antígeno de *T. cruzi*, tal como un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígenos 1F8, rTc24 (PGR24-His), TcF, SAPA, TSSA, SAPA/TSSA, SAPA/TSSA, FRA, B13, MACH (PEP2, TcD, TcE, SAPA), TcD, y TcE. En ciertas modalidades, el segundo antígeno tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, y SEQ ID NO:14. En otras modalidades, el antígeno quimérico puede comprender antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados y un antígeno IBMP 8.4 no modificado, en donde los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados contienen por lo menos un antígeno PEP2 y un segundo antígeno seleccionado del grupo que consiste en 1F8 rTc24 (PGR24-His).3 modificados contienen por lo menos un antígeno PEP2 y un segundo antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígenos 1F8, rTc24 (PGR24-His), TcF, SAPA, TSSA, SAPA/TSSA, SAPA/TSSA, FRA, B13, MACH (PEP2, TcD, TcE, SAPA), TcD, y TcE. Como se ha indicado anteriormente, en modalidades de ejemplo, el antígeno IBMP 8.1 modificado puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 2, y el antígeno

IBMP 8.3 modificado puede tener un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6. En determinadas modalidades, el antígeno a PEP2 puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

En otra modalidad de ejemplo de la presente invención, se proporciona un
5 inmunoensayo para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* que comprende el antígeno quimérico como se ha descrito anteriormente que incluye un antígeno modificado 8.1 y/o 8.3 modificado que contiene un antígeno PEP2 insertado en el mismo, junto con reactivos de detección de la inmunounión que proporcionan una señal que indica la inmunounión cuando un anticuerpo contra *Trypanosoma cruzi* se une a dicho
10 antígeno quimérico. Tal inmunoensayo puede seleccionarse del grupo que consiste en el inmunoensayo de flujo lateral, el ensayo de transferencia de múltiples antígenos, el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) directo o indirecto, el inmunoensayo enzimático, el ensayo intercalado, el ensayo de electroquimioluminiscencia, el inmunoensayo por tira reactiva y el ensayo radioisotópico.

En una modalidad alternativa, el antígeno quimérico del inmunoensayo puede construirse para incluir un antígeno 8.1 y/o 8.3 modificado que contenga un antígeno PEP2 insertado en el mismo junto con un antígeno IBMP 8.4 no modificado. Como también se indica en el presente documento, el antígeno quimérico para diagnosticar una infección de la enfermedad de Chagas de acuerdo con la invención puede comprender un antígeno IBMP
20 8.1 modificado y un antígeno IBMP 8.3 no modificado, en donde el antígeno quimérico IBMP 8.1 modificado contiene por lo menos un antígeno PEP2. Además, se proporciona un antígeno quimérico para diagnosticar una infección de la enfermedad de Chagas, en donde el antígeno quimérico comprende un antígeno IBMP 8.3 modificado y un antígeno IBMP 8.1 no modificado, en donde el antígeno quimérico IBMP 8.3 modificado contiene por lo menos un
25 antígeno PEP2.

El antígeno quimérico tal como se describe en el presente documento puede combinarse entonces con reactivos de detección de inmunounión los cuales proporcionan una señal que indica inmunounión cuando un anticuerpo contra *Trypanosoma cruzi* se une con dicho antígeno quimérico para formar un inmunoensayo adecuado de acuerdo con la
30 invención. El inmunoensayo puede ser un inmunoensayo de flujo lateral o cualquiera de los inmunoensayos convencionales conocidos en la técnica. En uso, el inmunoensayo se utiliza para recibir una muestra de un fluido corporal u otra matriz biológica de un sujeto o paciente humano o animal que se somete a determinar si los anticuerpos contra *T. cruzi* están

presentes, y la muestra se desplazará a través del inmunoensayo hasta una región de detección que incluye los reactivos de inmunounión como se ha expuesto anteriormente que pueden generar una señal indicativa de la unión de los antígenos en el inmunoensayo con anticuerpos de *T. cruzi* que están presentes en la muestra.

5 En otras modalidades adecuadas, los reactivos de detección de inmunounión del inmunoensayo de la invención pueden comprender aquellos reactivos que generan una señal que indica inmunounión cuando un anticuerpo contra *Trypanosoma cruzi* se une con dicho antígeno quimérico. La señal utilizada en el presente inmunoensayo puede ser cualquier material apropiado que proporcione una identificación visual o de otro tipo que indique que se
10 ha producido la inmunounión y que los anticuerpos contra *T. cruzi* están presentes en la muestra del sujeto. La señal en sí puede ser cualquier señal convencional utilizada en ensayos de diagnóstico, incluida una señal seleccionada del grupo que consiste en una señal colorimétrica, una señal fluorescente, una señal quimioluminiscente, una señal radiactiva y una señal visual.

15 En una modalidad de ejemplo, el presente inmunoensayo será un inmunoensayo de flujo lateral capaz de detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, y este ensayo de flujo lateral puede incluir los antígenos quiméricos modificados como se ha expuesto anteriormente. En ciertas modalidades, el antígeno quimérico modificado utilizado en el inmunoensayo de flujo lateral de la invención puede ser un antígeno quimérico
20 IBMP 8.1 y/o un antígeno quimérico IBMP 8.3 modificado que se modifica agregando por lo menos un antígeno PEP2. En otras modalidades, el antígeno quimérico modificado en este inmunoensayo de flujo lateral puede ser un antígeno quimérico IBMP 8.1 y/o un antígeno quimérico IBMP 8.3 modificado que incluyen cada uno por lo menos un antígeno PEP2 insertado en el mismo combinado con un antígeno quimérico IBMP 8.4 no modificado como
25 se describe más adelante. En otras modalidades, además del antígeno PEP2, los antígenos quiméricos modificados de la invención también pueden incluir un segundo antígeno *T. cruzi*, incluyendo aquellos antígenos seleccionados del grupo que consiste en antígenos 1F8, rTc24 (PGR24-His), TcF, SAPA, TSSA, SAPA/TSSA, SAPA/TSSA, FRA, B13, MACH (PEP2, TcD, TcE, SAPA), TcD, y TcE.

30 En otra modalidad de ejemplo de la invención, se proporciona un método de inmunoensayo para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en un sujeto humano o animal en donde el método de inmunoensayo comprende proporcionar el antígeno quimérico modificado descrito anteriormente el cual contiene por lo

menos un antígeno PEP2 insertado en un antígeno quimérico IBMP 8.1 modificado y/o un antígeno quimérico IBMP 8.3 modificado. El antígeno quimérico modificado de la invención se utilizará para determinar si un paciente humano o animal da positivo para la presencia de anticuerpos *T. cruzi*, por lo que se obtiene una muestra del paciente humano o animal para utilizar el método. Se obtiene una muestra adecuada a partir de un fluido corporal u otra matriz biológica del paciente, y esta muestra se pone en contacto con el antígeno quimérico modificado como se ha descrito anteriormente. En un método de ejemplo, la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* se lleva a cabo poniendo en contacto dicha muestra con dicho antígeno quimérico modificado de la invención; y determinando a continuación la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* mediante la detección de la inmunounión de dicho antígeno quimérico a *Trypanosoma cruzi* en dicha muestra.

En una modalidad alternativa, los antígenos 8.1 y 8.3 modificados pueden combinarse con un antígeno IBMP 8.4 no modificado para proporcionar la composición antigénica quimérica utilizada en el método de inmunoensayo de la presente invención. Este método de inmunoensayo puede llevarse a cabo en cualquier forma de inmunoensayo adecuada, tal como un inmunoensayo seleccionado del grupo que consiste en inmunoensayo de flujo lateral, ensayo de transferencia de múltiples antígenos, ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) directo o indirecto, inmunoensayo enzimático, ensayo intercalado, ensayo de electroquimioluminiscencia, inmunoensayo por tira reactiva y ensayo radioisotópico

En otra modalidad de ejemplo, los antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y 8.3 pueden utilizarse en un método de diagnóstico de una infección por la enfermedad de Chagas en un sujeto humano o animal. En tal método, se proporcionan los antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y 8.3 descritos anteriormente, en donde cada uno de dichos antígenos quiméricos contiene por lo menos un antígeno PEP2 incorporado. En este método de ejemplo, se obtiene una muestra de un paciente humano o animal, tal como un fluido corporal u otra matriz biológica, y esta muestra se pone en contacto con el antígeno quimérico modificado de la invención, tal como en una tira de prueba en un inmunoensayo; como un inmunoensayo de flujo lateral. En virtud del contacto de la muestra con el antígeno quimérico modificado de la invención, se determina la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* mediante la detección de la inmunounión del antígeno quimérico a anticuerpos *Trypanosoma cruzi* en la muestra, y la presencia de tales anticuerpos es indicativa de que el paciente humano o animal está infectado con la enfermedad de Chagas. Como se ha indicado anteriormente, tal método puede llevarse a cabo como un inmunoensayo de flujo lateral, pero pueden emplearse otras numerosas formas de inmunoensayos, incluidos los ensayos de

transferencia de múltiples antígenos, los ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA) directos o indirectos, los inmunoensayos enzimático, los ensayos intercalados, los ensayos de electroquimioluminiscencia, los inmunoensayos por tira reactiva y los ensayos radioisotópicos.

5 También se proporciona un método de inmunoensayo alternativo para detectar o diagnosticar una infección de la enfermedad de Chagas en un sujeto humano o animal, en donde los antígenos quiméricos modificados utilizados incluyen un antígeno IBMP 8.1 modificado y un antígeno 8.3 modificado, ambos de los cuales incluirán antígenos PEP2 implantados en los mismos, y también incluirán un antígeno IBMP 8.4 no modificado. Como
10 en el método descrito anteriormente, se proporciona el antígeno quimérico modificado, tal como en una tira de prueba, y se obtiene una muestra de fluido corporal u otra matriz biológica de un sujeto humano o animal y se pone en contacto con este antígeno quimérico modificado. Cualquier inmunounión resultante al antígeno refleja que hay anticuerpos de *T. cruzi* en la muestra y que el ser humano o el animal que se está analizando está infectado con la
15 enfermedad de Chagas. La inmunounión de dicho antígeno quimérico a *Trypanosoma cruzi* en dicha muestra puede determinarse mediante cualquier reactivo adecuado que pueda emitir un observable

 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una tira de prueba que puede utilizarse para determinar cualitativamente la presencia o ausencia de anticuerpos contra
20 *Trypanosoma cruzi* que serán indicativos de una infección por la enfermedad de Chagas. Tal tira de prueba puede estar hecha de una membrana de nitrocelulosa o de otros materiales que permitan el flujo a través de la tira de prueba, tal como por ejemplo por acción capilar, de modo que una muestra en un extremo de la tira migrará a través de la tira en donde la muestra pueda entrar en contacto con los antígenos quiméricos modificados de la invención, y de modo
25 que haya una zona de detección en la tira de prueba en donde se produzca una señal que refleje que se ha producido la inmunounión entre los antígenos quiméricos modificados de la tira de prueba y los anticuerpos de la muestra. Como se ha indicado anteriormente, la composición antigénica utilizada en dicha tira de prueba puede comprender un antígeno IBMP 8.1 modificado y un antígeno IBMP 8.3 modificado que incluyen ambos por lo menos un
30 antígeno PEP2 insertado en el mismo. Estos dos antígenos también pueden combinarse con un antígeno quimérico IBMP 8.4 no modificado en la composición antigénica utilizada en la presente invención. Tales tiras reactivas pueden utilizarse solas o en casetes u otros dispositivos en donde pueden utilizarse varias tiras reactivas al mismo tiempo.

En otra modalidad de ejemplo de la presente invención, se proporciona un dispositivo de inmunoensayo para realizar un inmunoensayo de anticuerpos contra *T. cruzi* en un sujeto humano o animal. El dispositivo comprende una tira de prueba que está previamente recubierta con el antígeno quimérico modificado de la invención que comprende los antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y 8.3, cada uno de los cuales tiene uno o más antígenos PEP2 insertados en el mismo. En ciertas modalidades, la mezcla antigénica de la tira de prueba del dispositivo también puede incluir un antígeno quimérico IBMP 8.4. Este dispositivo de inmunoensayo de la invención también incluye un reactivo de detección que detecta la unión entre dichos antígenos quiméricos modificados en la tira de prueba y un anticuerpo contra *T. cruzi* localizado en una muestra de fluido corporal u otra matriz biológica obtenida de un sujeto humano o animal. La tira de prueba puede estar compuesta por una membrana de nitrocelulosa, u otros materiales adecuados bien conocidos en el campo que se utilizan que experimentan una acción capilar o de mecha de modo que cuando se introduce un fluido en un extremo de la tira de prueba, ese fluido fluirá lateralmente hacia arriba por la tira de prueba de modo que cualquier anticuerpo de la muestra pueda combinarse con el antígeno quimérico modificado pre-recubierto como se describe en el presente documento. En una modalidad, los reactivos de detección generan una señal que indica que se ha detectado la unión de los anticuerpos de la muestra y los antígenos de la tira de prueba. Tal señal puede ser cualquier señal adecuada que pueda observarse visualmente o de otra forma, y tales señales pueden incluir una señal colorimétrica, una señal fluorescente, una señal quimioluminiscente, una señal radiactiva y una señal visual.

En otras modalidades de la presente invención, se proporciona un kit de prueba para detectar cualitativamente la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en una muestra de fluido corporal u otra matriz biológica de un humano o animal el cual comprende un antígeno quimérico modificado como se describe en el presente documento que comprende antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y 8.3 que tienen uno o más antígenos PEP2 insertados en el mismo. En otras modalidades, también puede utilizarse el antígeno quimérico IBMP 8.4.

En una modalidad, además del antígeno quimérico modificado como se ha descrito anteriormente, el kit de prueba también una tira de prueba en donde se pueden localizar los antígenos y reactivos de detección de inmunounión que se pueden agregar a la tira de prueba con el fin de proporcionar una señal indicativa de inmunounión de dicho antígeno quimérico cuando la muestra contiene anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*. En ciertas modalidades, la tira de prueba tendrá una zona de detección particular incluida en la misma en donde puede

observarse la señal indicativa de la inmunounión de dicho antígeno quimérico en la tira de prueba y los anticuerpos de *Trypanosoma cruzi* en la muestra. El kit también puede incluir dispositivos como un hisopo que recogen la muestra de un paciente que se va a analizar, y la muestra puede ser un fluido corporal u otra matriz biológica del paciente. Las muestras
5 adecuadas pueden ser un fluido corporal, suero, sangre entera, saliva y/u otras matrices biológicas. En el funcionamiento del kit de prueba, se obtiene una muestra de un paciente humano o animal sometido a prueba, por ejemplo mediante un bastoncillo de algodón u otro dispositivo adecuado, y la muestra puede colocarse en una solución tampón que también puede incluirse en el kit de prueba. Una vez obtenida la muestra y colocada en la solución
10 tampón, se aplica una cierta cantidad de la solución a la tira de prueba para que el fluido migre desde el punto de aplicación a través de la tira de prueba, de modo que pueda mezclarse con los antígenos quiméricos modificados en la tira de prueba, y alcanzar entonces una zona de detección en donde se genera (o no se genera) una señal que refleja la presencia o ausencia de anticuerpos *T. cruzi* en la muestra obtenida del paciente.

Aún más, la invención proporciona un sistema de inmunoensayo para detectar cualitativamente la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en un sujeto humano o animal que comprende los antígenos quiméricos modificados 8.1 y 8.3 anteriores, con o sin un antígeno 8.4 IBMP no modificado. Estos antígenos pueden localizarse en una tira de prueba a la que se aplica una muestra de fluido corporal u otra matriz biológica
20 del sujeto humano o animal que pueda aplicarse a dicha tira de prueba. El sistema también incluye un reactivo de detección de inmunounión que normalmente estará situado en dicha tira de prueba y el cual proporciona una señal que indica la inmunounión de los antígenos cuando la muestra contiene anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, y hay una zona de detección en dicha tira de prueba en donde se puede observar la señal indicativa de
25 inmunounión entre los antígenos de la tira de prueba y los anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*. La señal generada en virtud de la inmunounión puede seleccionarse del grupo que consiste en una señal colorimétrica, una señal fluorescente, una señal quimioluminiscente, una señal radiactiva y una señal visual. La tira de prueba puede estar hecha de una membrana de nitrocelulosa, pero también puede ser de cualquier material adecuado el cual experimente
30 una acción capilar, de modo que una muestra fluida pueda migrar lateralmente a través de la tira de prueba y que los anticuerpos de la muestra puedan unirse a los antígenos de la tira de prueba.

A continuación se describen con más detalle los antígenos, composiciones, métodos, sistemas, tiras reactivas, kits y otros aspectos de la presente invención que utilizan el antígeno

quimérico modificado como se describe en el presente documento para la determinación cualitativa de la presencia del parásito *T. cruzi* que causa la enfermedad de Chagas en humanos y animales se describen con más detalle en el presente documento .

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA DE DIBUJO

- 5 La figura 1 es una vista esquemática de la orientación y los componentes de un inmunoensayo de ejemplo de acuerdo con la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES DE EJEMPLO

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico veterinario, concretamente a una prueba para la detección rápida de anticuerpos contra enfermedades parasitarias infecciosas humanas y animales, tal como la enfermedad de Chagas. El propósito de la presente invención es proporcionar un método muy mejorado de detección de antígenos mediante anticuerpos contra *T. cruzi*, el parásito que causa la enfermedad de Chagas. En este caso, un antígeno es una proteína expresada por el parásito *T. cruzi* que generará anticuerpos en un sujeto humano o animal expuesto a *T. cruzi*. Cuando los antígenos se unen a un anticuerpo anti-*T. cruzi*, tal unión puede detectarse mediante diversos ensayos de diagnóstico. Sin embargo, existen limitaciones en el uso de antígenos para detectar enfermedades parasitarias como la enfermedad de Chagas, incluyendo el hecho de que ciertos antígenos pueden ser inespecíficos, es decir, que pueden ser reconocidos por anticuerpos presentes en un fluido corporal, pero esos anticuerpos podrían haber sido generados en virtud de la exposición a un parásito diferente. En consecuencia, ha sido un objetivo constante desarrollar dispositivos de pruebas de inmunoensayo más precisos que tengan un mayor porcentaje de identificación del parásito deseado y menos probabilidades de indicar resultados falsos positivos.

De acuerdo con la presente invención, los inventores han descubierto que la adición de antígenos particulares y/o fragmentos de antígenos a un antígeno quimérico existente puede mejorar en gran medida la sensibilidad, especificidad y precisión de un ensayo al aumentar el número de proteínas expresadas por el parásito *T. cruzi* presentadas a anticuerpos anti-*T. cruzi* humanos o animales. Esto aumentará en gran medida la probabilidad de un reconocimiento preciso por parte de los anticuerpos circulantes en la sangre total o el suero de los mamíferos. Al mismo tiempo, como se ha indicado anteriormente, la adición de antígenos particulares o fragmentos de los mismos tiene que plantearse con mucho cuidado para no incluir aquellos antígenos o fragmentos que puedan ser reconocidos por parásitos que no sean *T. cruzi*. En consecuencia, sigue siendo necesario mejorar la sensibilidad y

especificidad de los diagnósticos diseñados para detectar *T. cruzi* por encima de los ensayos actuales disponibles en el mercado, como el ensayo de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA) o los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Un área que se ha examinado con respecto a los antígenos que pueden ser útiles en la detección de anticuerpos de *T. cruzi* han sido las proteínas quiméricas IBMP 8.1,8.2, 8.3 y 8.4 que se han examinado en una serie de experimentos relacionados con el reconocimiento de estos antígenos. Sin embargo, en algunos casos, los resultados variaron, y algunas pruebas incluso parecían mostrar que el antígeno quimérico 8.3 IBMP era menos eficaz en el reconocimiento. Estos antígenos quiméricos constituyen diferentes regiones antigénicas combinadas de *T. cruzi*, y las regiones de los antígenos quiméricos IBMP 8.18.4 se han caracterizado y secuenciado como se refleja a continuación:

Tabla 1 - Regiones de los antígenos quiméricos IBMP 8.1-8.3

Antígeno quimérico	Nombre de la secuencia	Intervalo de aminoácidos	ID de la secuencia del banco de genes
IBMP-8.1	Trans-sialidasa	747-774	XP_820062.1
	proteína ribosomal 60S L19	218-238	XP.820995.1
	Trans-sialidasa	1435-1449	XP_813586.1
	Antígeno de superficie 2 (CA-2)	276-297	XP.813516.1
IBMP-8.2	Antígeno, parcial	13-73	ACM47959.1
	Antígeno de superficie 2 (CA-2)	166-220	XP_818927.1
	Peptidasa de cisteína calpaína	31-97	XP_804989.1
IBMP-8.3	Trans-sialidasa	710-754	XP.813237.1

Proteína de antígeno repetitivo flagelar	15-56	AAA30177.1
proteína ribosomal 60S L19	236-284	XP.808122.1
Antígeno de superficie 2 (CA-2)	279-315	XP_813516.1

Tabla 2 - Regiones de los antígenos quiméricos IBMP 8.4

Antígeno quimérico	Nombre de la secuencia	Intervalo de aminoácidos	ID de la secuencia del banco de genes
IBMP-8.4	Antígeno secretado en fase aguda	681-704	CAA40511.1
	Proteína de membrana de kinoplastido KMP-11	76-92	XP.810488.1
	Trans-sialidasa	1436-1449	XP.813586.1
	Proteína de antígeno repetitivo flagelar	20-47	AAA30177.1
	Trans-sialidasa	740-759	XP.820062.1
	Antígeno de superficie 2 (CA-2)	276-298	XP.813516.1
	Proteína de antígeno repetitivo flagelar	1-68	AAA30197.1
	Proteína ribosomal L19 60S	218-238	XP.820995.1

Anteriormente, se examinaron los antígenos quiméricos IBMP 8.1, 8.2, 8.3 y 8.4 en una serie de experimentos relacionados con el reconocimiento de estos antígenos. Sin embargo, en algunos casos, los resultados variaron, y algunas pruebas parecían mostrar que el antígeno quimérico IBMP 8.3 era menos eficaz en el reconocimiento que los otros antígenos
5 IBMP. Estos antígenos quiméricos constituyen diferentes regiones antigénicas combinadas de *T. cruzi*, y las regiones de los antígenos quiméricos IBMP 8.1-8.4 han sido caracterizadas y secuenciadas como se refleja a continuación:

Al revisar las secuencias de los distintos antígenos quiméricos IBMP 8.1-8.4, se determinó que, aunque existen regiones en común, estos dos antígenos quiméricos carecían
10 del epítipo conservado PEP2. Este antígeno de *T. cruzi* ha sido identificado previamente y es una secuencia de 22 aminoácidos que tiene la secuencia GDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQA (SEQ ID NO: 7). Houghton et al., *J. Infect. Dis.* 179:1226-34 (1999):

Como resultado de esta información, los presentes inventores determinaron que la adición del fragmento de aminoácido PEP2 en el antígeno quimérico IBMP 8.1 y/o IBMP 8.3
15 podría utilizarse para mejorar en gran medida la sensibilidad, especificidad y precisión de los inmunoensayos diseñados para detectar antígenos de *T. cruzi* y, de este modo, poder mejorar en gran medida la capacidad de diagnóstico de la enfermedad de Chagas en pacientes humanos o animales como los mamíferos, incluidos los animales domésticos como gatos y perros, los cuales a menudo se ven afectados por esta enfermedad.

En una modalidad adecuada de la presente invención, los antígenos quiméricos IBMP
20 8.1 y/o IBMP 8.3 modificados se incorporarán en un inmunoensayo de diagnóstico tal como un ensayo de flujo lateral. Dicho ensayo puede usarse para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* y puede comprender los antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y/o 8.3 que se modifican para contener un antígeno PEP2 insertado en
25 los mismos. El ensayo también puede incluir reactivos de detección de inmunounión adecuados que proporcionan una señal que indica inmunounión cuando un anticuerpo contra *Trypanosoma cruzi* se une con dichos antígenos quiméricos modificados. Además de los antígenos IBMP 8.1 y/o 8.3 modificados descritos anteriormente, la composición antigénica de la invención también puede incluir el antígeno IBMP 8.4 no modificado, como el que tiene
30 la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 descrita en el presente documento. En

cualquier caso, la composición de antígeno quimérico modificado de la invención puede combinarse con reactivos de detección de inmunounión que proporcionan una señal que indica inmunounión cuando un anticuerpo contra *Trypanosoma cruzi* se une con dicho antígeno quimérico para formar un inmunoensayo adecuado de acuerdo con la invención.

5 Estos ensayos se utilizan obteniendo una muestra de un fluido corporal u otra matriz biológica de un sujeto o paciente humano o animal que se somete a pruebas para determinar si los anticuerpos contra *T. cruzi* están presentes, y la muestra se desplazará a través del inmunoensayo hasta una región de detección que incluye los reactivos de inmunounión según lo establecido anteriormente que pueden generar una señal indicativa de la unión de los
10 antígenos en el inmunoensayo con anticuerpos de *T. cruzi* que están presentes en la muestra.

La presente invención es ventajosa porque la modificación del número de fragmentos de aminoácidos en los antígenos quiméricos IBMP 8.1 e IBMP 8.3 para incluir PEP2 resulta en una gran mejora con respecto a la sensibilidad, especificidad y precisión de un ensayo que incluye los antígenos modificados de la invención. La mejora aumenta así la capacidad de
15 detectar y diagnosticar con precisión la enfermedad de Chagas en humanos y animales de compañía. Además, estas modificaciones superan las deficiencias de las pruebas comerciales actuales, incluidos problemas como los falsos negativos debidos a la variación del antígeno en los múltiples tipos de cepas existentes en el mundo. La presente invención también proporciona la capacidad de detectar antígenos a varios niveles asociados con diferentes
20 fases de la enfermedad de Chagas.

En otras modalidades de ejemplo, se proporciona un antígeno quimérico para diagnosticar una infección de la enfermedad de Chagas, en donde el antígeno quimérico comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y un antígeno IBMP 8.3 no modificado, en donde el antígeno quimérico IBMP 8.1 modificado contiene por lo menos un antígeno PEP2. Además,
25 se proporciona un antígeno quimérico para diagnosticar una infección de la enfermedad de Chagas, en donde el antígeno quimérico comprende un antígeno IBMP 8.3 modificado y un antígeno IBMP 8.1 no modificado, en donde el antígeno quimérico IBMP 8.3 modificado contiene por lo menos un antígeno PEP2. Como se indica más adelante, en las composiciones antigénicas de la invención, esta construcción también puede incluir un antígeno IBMP 8.4 no
30 modificado en combinación con los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados como se describe en el presente documento.

En un ejemplo de ejemplo de la invención, se proporciona un ensayo de flujo lateral que contiene la composición de antígeno quimérico modificado identificada anteriormente. En

tal ejemplo, la composición antigénica comprende los antígenos quiméricos IBMP-8.1 y/o IBMP-8.3 modificados de *T. cruzi* se utilizarán en tiras de ensayo, tales como las hechas de una membrana de nitrocelulosa, y los antígenos se dispensan en paralelo con el control de reacción del ensayo en las tiras de ensayo como parte de una plataforma de inmunocromatografía de flujo lateral. En una prueba de ejemplo, el ensayo comprende una tira multimembrana dispuesta secuencialmente en una tarjeta adhesiva que contiene una almohadilla de muestra, una almohadilla de conjugado, la composición de antígeno quimérico, una membrana de nitrocelulosa impregnada de control y una membrana residual o mecha. La tira de prueba del ensayo de la invención puede colocarse dentro de un dispositivo como un casete de plástico en donde tiene lugar la reacción después de obtener una muestra de un paciente humano o animal, combinarla con un tampón y aplicarla sobre la tira de prueba.

En un ejemplo adecuado, el dispositivo de la invención contiene una abertura para la dispensación de la muestra/tampón de corrida en una parte de la tira de prueba, y una ventana de visualización de la reacción en el punto en donde puede aparecer una señal que refleje la inmunounión. En un ejemplo ilustrativo, se dispensan de uno a cinco (1-5) microlitros de la muestra en la abertura del lado de dispensación, seguidos de la adición de 1 -3 gotas de tampón de corrida para permitir que el líquido de la muestra fluya a lo largo de la tira de prueba. La mezcla migra por acción capilar, eluyendo el conjugado a una zona de prueba donde se encuentran los antígenos impregnados en la tira de prueba. El exceso de componentes migra hacia el extremo opuesto de la tira, donde quedan retenidos mediante una almohadilla de mecha u otro agente secante. Los resultados de las pruebas de inmunoensayo pueden obtenerse de varias maneras en función de la señal generada por los reactivos de inmunounión, y tales señales pueden ser visuales para que sean fácilmente observables por el clínico que administra la prueba. En un ejemplo adecuado, los resultados pueden aparecer visualmente para el clínico después de 5-10 minutos tras la dispensación de la muestra a temperatura ambiente (promedio 22 °C), pero también puede obtenerse de diversas formas adecuadas, como por ejemplo adquiriendo una imagen fotográfica digital de la zona de detección. En ciertas modalidades, los resultados positivos pueden caracterizarse por la presencia de señales colorimétricas, por ejemplo, bandas de color gris-verde en la línea de prueba que contiene los antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y/o 8.3, de forma óptima con el antígeno IBMP-8.4). Puede proporcionarse otra señal colorimétrica como control, por ejemplo un control rojo el cual garantice que la muestra ha migrado lo suficiente a través de la tira de prueba. En un ejemplo adecuado, tras la prueba, la línea de control roja que aparece sola indicará una prueba negativa, en la cual la presencia de la línea gris-verde además de la línea de control roja indicará un resultado positivo de la prueba.

En el dibujo esquemático de la Figura 1 se muestra otra modalidad de ejemplo de un ensayo de acuerdo con la presente invención. Esta figura muestra la orientación del ensayo en la tira de prueba, y en esta modalidad, una tira de prueba tiene una almohadilla de muestra donde se aplica la muestra, y se añade una almohadilla filtro a lo largo de la tira de prueba que puede filtrar elementos indeseables en la muestra. En un punto en el centro de la tira de prueba, hay una línea de prueba en donde se encuentra el antígeno quimérico modificado de la invención, y ésta contendrá el antígeno de tal manera que los anticuerpos contra *T. cruzi* se unirán con el antígeno quimérico modificado de la invención, y tal unión generará una señal que puede observarse por medios visuales u otros medios adecuados. La tira de prueba también contiene una línea de control que mostrará que la muestra ha migrado lo suficiente por toda la tira de prueba, incluida la zona de prueba en donde se encuentran los antígenos. Por último, puede incluirse una almohadilla de mecha en el extremo de la tira de prueba opuesto a la almohadilla de muestra, que impedirá que el líquido vaya más allá.

En la modalidad de ejemplo descrita anteriormente y mostrada en la Figura 1, la línea de control está compuesta de estreptavidina-40 relacionada con un colorante adecuado, de modo que el fluido que llegue a la línea de control proporcionará una señal colorimétrica que indicará que la prueba es válida. El antígeno quimérico modificado se recubre en la tira de prueba para que pueda unirse a un anticuerpo *T. cruzi* de la muestra, y la unión del *T. cruzi* se muestra mediante reactivos de detección los cuales en este caso comprenden un anticuerpo antiespecie que se unirá al anticuerpo *T. cruzi*, y el anticuerpo antiespecie está conectado con un marcador o señal tal como una nanoesfera de oro (GNS) de 150 nm que puede proporcionar una señal colorimétrica cuando un anticuerpo *T. cruzi* de la muestra se une al antígeno quimérico modificado en la tira de prueba.

Como se ha indicado anteriormente, la composición antigénica de la presente invención comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y/o un antígeno 8.3 modificado, estando dichos antígenos modificados por la inclusión en los mismos de uno o más antígenos PEP2. En modalidades de ejemplo, los antígenos PEP2 pueden colocarse en cualquier ubicación adecuada del antígeno IBMP 8.1 o del antígeno 8.3, tal como en cualquiera de las regiones especificadas en las Tablas anteriores que establecen los diversos antígenos que constituyen el antígeno quimérico. Estas regiones en el antígeno quimérico IBMP 8.1 incluyen las regiones trans-sialidasa en los rangos de aminoácidos 747-774 y 1435-1449, respectivamente, la proteína ribosomal 60S L19 en 218238, y el antígeno de superficie 2 (CA-2) en aa 279-315. En el antígeno quimérico IBMP 8.3, estas regiones incluyen la región trans-sialidasa en los aminoácidos 710-754, la proteína del antígeno repetitivo flagelar en los

aminoácidos 15-56, la proteína ribosomal 60S L19 en los aminoácidos 236284, y el antígeno de superficie 2 (CA-2) en los aminoácidos 279-315. El PEP2 puede insertarse idealmente entre cualquiera de estas regiones o en cualquier otro lugar adecuado a lo largo de los antígenos quiméricos 8.1 y 8.3 para maximizar el efecto antigénico de todos los antígenos en los antígenos quiméricos IBMP.

En una modalidad de ejemplo, el antígeno quimérico IBMP 8.1 modificado incluye un único antígeno PEP2 incorporado en el mismo, pero también son posibles modificaciones en donde se inserte más de un antígeno PEP2. En una modalidad adecuada, se proporciona un IBMP 8.1 modificado que tiene dos antígenos PEP2 insertados en él y tiene la secuencia de aminoácidos indicada a continuación como SEQ ID NO: 1, o puede tener un antígeno PEP2 insertado como se muestra en la SEQ ID NO. 2: Como se indica a continuación en la Tabla 3, los antígenos quiméricos IBMP 8.1 se muestran con la secuencia etiqueta His 6X como se indica por la secuencia MGSSHHHHHH al principio de cada secuencia, y la secuencia también incluye un codón de parada al final para indicar la terminación de la secuencia, designado por los puntos. Esta secuencia de iniciación y el codón de parada se muestran a continuación en todas las secuencias.

Tabla 3: Secuencias de ejemplo para antígenos quiméricos 8.1 modificados	
MGSSHHHHHHGSEEGSRGDSSMPASASEEGSRGDSSMPAKAAIAPAKAAAAPAKAAAAPAAEPKSAEPKPAEPKSGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQA.. (SEQ ID NO: 1)	
MGSSHHHHHHGSEEGSRGDSSMPASASEEGSRGDSSMPAKAAIAPAKAAAAPAKAAAAPAAEPKSAEPKPAEPKSGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAGDKPSPFGQA (SEQ ID NO: 2).	

En otra modalidad de ejemplo de la invención, uno o más antígenos PEP2 se insertan en ubicaciones adecuadas en el antígeno quimérico modificado IBMP 8.3 de la invención. Como se ha indicado anteriormente, el antígeno PEP2 se inserta en el antígeno quimérico IBMP 8.3 en cualquier ubicación adecuada que maximice el efecto inmunogénico de los antígenos cuando se utilicen en pruebas de diagnóstico para determinar la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en sujetos humanos o animales. A continuación se muestran modalidades de ejemplo del antígeno quimérico 8.3 modificado en donde se insertan uno o

más antígenos PEP2 en múltiples ubicaciones.

Tabla 4: Secuencias de ejemplo para antígenos químicos 8.3 modificados
MGSSHHHHHHGPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPK PAEKVAEAEKQKAAEATKVAAEAKQRAAEATKVAE AEKQKAAEATPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPPA KAAAPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDKP.. (SEQ ID NO: 3)
MGSSHHHHHHHGPKEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPK PAEKVAEAEKQKAAEATKVAAEAKQRAAEATKVAE GDKPSFPGQAAAGDKPSPFGQAAEKKQKAAEATPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAP PAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDKPS PFGQAAAGDKP.. (SEQ ID NO: 4)
MGSSHHHHHHHGPKEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPK PAEKVAEAEKQKAAEATKVAAEAKQRAAEATKVAE GDKPSFPGQAAAGDKPSPFGQAAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAEEKQKAAE ATPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPSPF GQAAAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDKP.. (SEQ ID NO: 5)
MGSSHHHHHHHGPKEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPK PAEKVAEAEKQKAAEATKVAAEAKQRAAEATKVAE GDKPSFPGQAAGDKPSPFGQAAGDKPSPFGQAAGDKPSPFGQAAGDKPSPFG QAEEKQKAAEATPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAPPAKAAAAP PAKAAAAPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAGDKPSPFGQAAGDKP.. (SEQ ID NO: 6)

En modalidades adicionales, la presente invención se refiere a un antígeno quimérico IBMP modificado para su uso en la detección del parásito *Trypanosoma cruzi* en seres humanos y animales con mayor precisión y menos falsos positivos. En este antígeno quimérico IBMP modificado, los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 se modifican para su uso en la detección de la presencia de *Trypanosoma cruzi* con el fin de diagnosticar la enfermedad de Chagas en un paciente humano o animal, y la modificación puede obtenerse insertando el péptido PEP2 y opcionalmente otros antígenos *T. cruzi* en los antígenos IBMP 8.1 y/o 8.3, y utilizando los anticuerpos modificados para detectar la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en pacientes humanos y animales. Se utiliza un antígeno IBMP 8.4 junto con los antígenos 8.1 y 8.3 modificados. Los antígenos quiméricos modificados que incluyen los

antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados junto con IBMP 8.4 pueden utilizarse en un ensayo de flujo lateral u otros ensayos adecuados para la detección de *T. cruzi* y el diagnóstico en un paciente humano o animal de una infección por la enfermedad de Chagas. Los kits de prueba que emplean estos antígenos quiméricos también se proporcionan como se describe más adelante.

En un aspecto de ejemplo de la presente invención se proporciona un antígeno quimérico el cual comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y/o un antígeno IBMP 8.3 modificado, en donde cualquiera de los dos antígenos IBMP 8.1 y/o 8.3 modificados contienen por lo menos un antígeno PEP2 insertado en el mismo. El PEP2 puede insertarse en los antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y/o 8.3 en cualquier lugar adecuado donde complemente el efecto antigénico de la proteína IBMP y proporcione una prueba más precisa y sensible para detectar la presencia de antígenos de *T. cruzi* en pacientes humanos y animales. Las inserciones de PEP2 pueden estar en una variedad de ubicaciones, como en muchas de las regiones específicas de los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 descritas en el presente documento.

Como se ha indicado anteriormente, se proporcionan ejemplos específicos en donde el antígeno IBMP 8.1 modificado tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NOS: 1 o 2, y se proporcionan otros ejemplos adecuados en donde el antígeno IBMP 8.3 modificado de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOS 3-6. También son posibles otras formas adecuadas de inserción de PEP2 dentro de la presente invención, como comprenderían las personas normalmente versadas en la técnica. En estas modalidades, los antígenos 8.1 y 8.3 IBMP modificados pueden contener un antígeno PEP2 o una pluralidad de antígenos PEP2 según sea necesario para maximizar la utilidad de estos antígenos en la formación de un ensayo de prueba eficiente y altamente preciso para anticuerpos de *T. cruzi* e infecciones de la enfermedad de Chagas en pacientes humanos y animales.

En otra modalidad de ejemplo, se proporciona un antígeno quimérico para diagnosticar una infección de la enfermedad de Chagas, en donde el antígeno quimérico comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y un antígeno IBMP 8.3 modificado, en donde los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados contienen por lo menos un antígeno PEP2. Como se indica más adelante, en la composición antigénica de la invención, esta construcción también puede incluir un antígeno IBMP 8.4 no modificado en combinación con los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados como se describe en el presente documento.

De acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse el antígeno quimérico modificado de la invención para su uso en el diagnóstico de una infección de la enfermedad de Chagas el cual comprende los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados descritos anteriormente los cuales incluyen por lo menos un antígeno PEP2, pero también incluyen un
5 segundo antígeno de *T. cruzi*. Como se ha indicado anteriormente, hay una serie de antígenos inmunogénicos en *T. cruzi*, y uno o más de ellos pueden insertarse en los antígenos 8.1 y 8.3 modificados de la presente invención. En ciertas modalidades, los antígenos adicionales de *T. cruzi* pueden seleccionarse del grupo que consiste en los antígenos 1F8, rTc24 (PGR24-His), TcF, SAPA, TSSA, SAPA/TSSA, SAPA/TSSA, FRA, B13, MACH (PEP2,
10 TcD, TcE, SAPA), TcD, y TcE. En ciertas modalidades, el segundo antígeno tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, y SEQ ID NO:14, y estas secuencias se muestran a continuación en la Tabla 5.

Secuencias de ejemplo para el segundo antígeno a incluir en los antígenos quiméricos 8.1 y/o 8.3 modificados son las siguientes:

Tabla 5: Secuencias de ejemplo para el segundo antígeno incluido en los antígenos quiméricos 8.1 y/o 8.3 modificados

SARA

MGRTVVGASRMFWLTHFVPLLLALCPSEPAHALAPGSSRVELFKRQNSTVPFEE
NGEVRRQRVVHSFRLPALVNVGDGVMVAIADARYDTSNDNSLIDTVVKYSVDDGET
WETQIAIKNSRASSVSRVVDPTVIVKGNKIYVLVGSYNSSTSYWTSHGDARDWDI
LLAVGEVTKSIVDGKTTANITWGSPVSLKEFFPAYMEGMHTNQFLGGAGVAIVAS
NGNLVYPVQVTNKRKQVFSKIFYSEDDGKTWKFGKGRSDFGCSEPVALEWEGK
LIINTRVDYRRRLVYESSDTEKPWVEAVGTLSRCWGPSPKSDQPGSQSSFTAVTI
EGMRVMLFTHPLNFKGWWLRDRLNLWLTDNQRIYNVGQLSIGDENSAYSSVLY
KDDKLYCLHEINSNEVYSLVFARLVGELRIKSVLQSWKKWDSHLSSICTPADPAA
SSSERVCGPAVTTVGLAGFLSHSANKTKWKDAYRCVDASTANAERVSNGLKFA
GVGGGALWPVSQQGQNQRYRFANHAFTLVASVTIHEAPSVASPLLGAULDSSG
GKKLLGLSYDEKHQWQPIYGSTPVTPTGSWETGKRYHVVLTMANRNGSVYVDG
ELLKGSGQTVPDRTPDISHFYVGGYGRSDMPTISHVTVNNVLLYNRQLNAEEIK
TLFLSQDLIGTEAHMDSSSDSSAHGTPSTPVDSTAHTPSTPADSSAHSTPSTPA
DSSAHSTPSTPVDSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPVDSTAHT
TPSTPADSSAHSTPSTPVDSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPVDSSAHSTPSTPAD
SSAHGTPSTPVDSSAHSTPSTPADSSANGTVLILPDGAALSTFSGGGLLLCACAL
LLHVFFTAVFF (SEQ ID NO: 11)

TSSA MTTCRLLCALLALALCCCLXACTTANGGSTXSTPPSGTENKPAXGEAPSQPGAS SGEAEASS (SEQ ID NO: 12)
FRA MEQERRQLEKDP RRNAKEIAALEESMNARAQELAREKKLADRAFLDQKPERVP LADVPLDDDSDFVA (SEQ ID NO: 13)
B13 PPPFQAAAAGDKPSPFGQAAAAGDKPPPFQAAAAGDKPSPFGQAAAAGDKPPPF GQAAAAGDKPSPFGQAAAAGGKPPPFQAAAAGDKPSPFGQAAAAGDKPPPFQAAA AGDKPSPFGQAAAAGDKPPPFQAAAAGDKPPPFQAAAAGDKPPPFQAAAAGDK PAPFGQAAEGDKPPPFQAAAADKPSLFGQAAAAGDKLSLFGQAAAAGDKPPPFQ QAAEGDKPPPFQAAAAGD (SEQ ID NO: 14)

En otras modalidades, el antígeno quimérico puede comprender antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados y un antígeno quimérico IBMP 8.4 no modificado. En ciertas modalidades, el antígeno quimérico IBMP no modificado puede tener la siguiente secuencia:

MGSSHHHHHHGDSTAHGTPSTPADSSAHSTPSTPAKFAELLEQQKNAQFPGKEP
KSAEPKPAEPKSEKQKAAEATKVAEAEKQRAAE
ATKVAEASSMPASASEEGSRGDSSMPAGDKPSPFGQAAAAGDKPSPFGQAAMEQE
RRQLEKDP RRNAKEIAALEESMNARAQELARE
KKLADRAFLDQKPERVP LADVPLDDDSDFVAKAAIAPAKAAAAPAKAAAAPAALPQ
EEQEDVGPRHVDPDHFRSTTQDAYRPVDPSAY KR.(SEQ ID NO: 8)

5 Como también se ha indicado anteriormente, el antígeno quimérico de la invención puede comprender antígeno IBMP 8.1 modificado y/o un antígeno IBMP 8.3 modificado, y en ciertas modalidades de ejemplo, el antígeno quimérico puede comprender un antígeno 8.1 modificado combinado con un antígeno IBMP 8.3 no modificado, y viceversa en donde un

10 antígeno IBMP 8.3 modificado se combina con un antígeno IBMP 8.1 no modificado.. En ambos casos, estos antígenos también pueden combinarse con un antígeno quimérico IBMP 8.4 no modificado, tal como se describe en el presente documento.

En ciertas modalidades, el antígeno quimérico IBMP 8.1 no modificado puede tener la

siguiente secuencia:

MGSSHHHHHHGSEEGSRGDSSMPASASEEGSRGDSSMPAKAAIAPAKAAAAPAK
AAAAPAAEPKSAEPKPAEPKSGDKPSPFGQAAA
GDKPSPFGQA .(SEQ ID NO: 9)

En ciertas modalidades, el antígeno quimérico IBMP 8.3 no modificado puede tener la siguiente secuencia:

MGSSHHHHHHGPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPA
EKVAEAEKQKAAEATKVAEAEKQRAAEATKVAE
AEKQKAAEATPAKAAAPPAKAAAPPAKAAAPPAKAAAPPAKAAAPPAKAAAPPAKAA
AAPSPFGQAAAAAGDKP.. SEQ ID NO: 10)

5

En ciertas modalidades de ejemplo, los antígenos IBMP 8.1 y/o 8.3 modificados y el antígeno IBMP 8.4 no modificado pueden utilizarse como se ha descrito anteriormente, o los antígenos IBMP 8.1 y/o 8.3 modificados pueden contener además un segundo antígeno además de uno o más antígenos PEP2 como se establece en el presente documento. En ciertas modalidades, el segundo antígeno puede seleccionarse del grupo que consiste en los antígenos 1F8, rTc24 (PGR24-His), TcF, SAPA, TSSA, SAPA/TSSA, SAPA/TSSA, FRA, B13, MACH (PEP2, TcD, TcE, SAPA), TcD, y TcE. Como se ha indicado anteriormente, en modalidades de ejemplo, el antígeno IBMP 8.1 modificado de la invención puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO. 2, y los antígenos IBMP 8.3 modificados de la invención pueden tener un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6. En determinadas modalidades, el antígeno a PEP2 puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

De acuerdo con la invención se proporciona un inmunoensayo cualitativo, basado en membrana para detectar *Trypanosoma cruzi*, en suero canino y matrices de sangre total aplicando los antígenos quiméricos modificados como se describe en el presente documento que incluyen una región PEP2 insertada para aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo. Como se indica en el presente documento, hay muchas formas de inmunoensayo que pueden utilizarse de acuerdo con la invención, y las modalidades de ejemplo para llevar a cabo el presente método de diagnóstico incluyen un inmunoensayo de flujo lateral, un ensayo de puntos de antígenos múltiples; y un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Además, la presente invención también puede utilizar un ensayo de inmunounión por puntos que consiste en alinear el repertorio de antígenos en una membrana de nitrocelulosa

reformateada en un formato de inmunoensayo por tira reactiva.

Como se indica en el presente documento, se proporciona un método para determinar la presencia de anticuerpos frente a *T. cruzi* en un paciente humano o animal de acuerdo con la invención en donde el antígeno quimérico como se describe en el presente documento se utiliza en un inmunoensayo de una muestra del sujeto humano o animal, y la presencia de anticuerpos frente a *T. cruzi* en la muestra se determina mediante la identificación de la unión cuando la muestra se pone en contacto con el antígeno quimérico de la invención. Como se indica en el presente documento, la determinación de la presencia de anticuerpos que se unen a los antígenos quiméricos descritos puede realizarse utilizando cualquier enfoque adecuado, incluyendo pero sin limitarse a cualquier tipo de ensayo inmunoenzimático (ELISA), incluyendo pero sin limitarse a un ELISA directo, un ELISA intercalado, un ELISA competitivo y un ELISA inverso.

En ciertas modalidades, el antígeno quimérico descrito en el presente documento puede incorporarse a un dispositivo de inmunodiagnóstico, como un dispositivo microfluídico, un dispositivo de flujo lateral y similares. En modalidades no limitativas, la divulgación proporciona un dispositivo configurado para generar una señal que se basa en anticuerpos unidos a los antígenos quiméricos de la invención. En otras modalidades, la señal es accesible ópticamente de modo que por lo menos algunos anticuerpos, si están presentes en la muestra biológica, se unen al antígeno quimérico tal como se describe en el presente documento. En ciertas modalidades, los anticuerpos están unidos al antígeno quimérico, y el ensayo comprende además anticuerpos marcados detectables unidos a los anticuerpos que están unidos a los antígenos quiméricos. Así, en un enfoque, la divulgación incluye la determinación de una señal a partir de los anticuerpos marcados detectables.

Los anticuerpos de detección u otro agente de detección pueden marcarse con cualquier etiqueta detectable adecuada. En ciertas modalidades, las etiquetas detectables producen una señal que comprende luz UV (<380 nm), luz visible (380-740nm) o luz roja lejana (>740 nm). En ciertas modalidades, la señal detectable comprende una señal fluorescente, y pueden utilizarse unidades de luz relativas (RLU) para determinar las proporciones de las señales de diferentes anticuerpos. Además, en los métodos de la divulgación puede utilizarse un ensayo basado en células como el descrito en el presente documento. En determinadas modalidades, también puede utilizarse un láser adecuado. Además, en los ensayos de acuerdo con la invención, puede utilizarse cualquier generador de imágenes adecuado situado cerca de las muestras analizadas, así como óptica de espacio

libre, para detectar una señal del ensayo utilizando cualquier dispositivo de detección de señales adecuado, como una cámara CCD situada cerca del lugar donde se genera una señal detectable.

En otras modalidades, se proporciona un dispositivo microfluídico para su uso en el análisis de muestras que puede comprender, entre otras características, una guía de ondas ópticas para transmitir una señal a cualquier dispositivo de medición adecuado, de tal manera que la accesibilidad óptica a la muestra no es necesariamente requerida para detectar la señal. En algunas modalidades, se utiliza una óptica sin lente y/o un método de obtención de imágenes basado en teléfonos móviles. En estas modalidades, uno o más segmentos de un dispositivo de ensayo en el cual se realiza el análisis de anticuerpos descrito pueden estar conectados o en comunicación con un procesador digital y/o un computador que ejecute *software* para interpretar la presencia, ausencia, cantidad o una proporción de anticuerpos que se unen a los antígenos quiméricos como se describe en el presente documento. El procesador puede ejecutar *software* y/o implementar un algoritmo para interpretar una señal detectable ópticamente y generar una salida legible por la máquina y/o el usuario. En una modalidad de ejemplo, un dispositivo de ensayo utilizado para realizar el análisis de anticuerpos puede integrarse o insertarse de otro modo en un adaptador que comprenda un dispositivo de detección, tal como una cámara, o un microscopio, incluyendo pero sin limitarse a un microscopio fluorescente. En otras modalidades de ejemplo, un medio de almacenamiento legible por computador puede ser un componente de un dispositivo de ensayo de acuerdo con la presente divulgación, y puede utilizarse durante o después de realizar cualquier ensayo o uno o más pasos de cualquier ensayo descrito en el presente documento. En ciertas modalidades, el medio de almacenamiento informático es un medio no transitorio y, por lo tanto, puede excluir señales, ondas portadoras y otras señales transitorias.

En otras modalidades de ejemplo, los antígenos quiméricos modificados y/o una combinación de antígenos quiméricos modificados y no modificados de acuerdo con la presente divulgación se utilizan en un dispositivo conocido en la técnica como dispositivo "BioCD", por lo que puede no ser necesario utilizar etiquetas detectables. En estas modalidades de ejemplo, el BioCD es un biosensor BioCD de contraste de fase diferencial, como el descrito en "Biosensor BioCD de contraste de fase diferencial", *Appl Opt.* 46:6196-6209 (2007), cuya descripción completa se incorpora por referencia. En ciertas modalidades, los antígenos quiméricos descritos actualmente se utilizan en un dispositivo y/o método como se describe en las patentes de EE. UU. 10,100,092, 7,910,356, 7,787,126, and 7,663,092, dichas patentes se incorporan por referencia como si se expusieran en su totalidad en el

presente documento, incluyendo las divulgaciones de dispositivos para su uso en inmunoensayos, y métodos de uso de los dispositivos, de acuerdo con la presente invención.

En otras modalidades de ejemplo, el resultado de un ensayo puede obtenerse utilizando un método y/o dispositivo y/o sistema que puede compararse con cualquier referencia adecuada, ejemplos de los cuales pueden incluir una o varias muestras de control, una o varias curvas normalizadas, y/o controles diseñados experimentalmente, tal como un valor de entrada conocido. En otras modalidades, el control puede utilizar una configuración antígeno/anticuerpo diferente de las configuraciones antígeno/anticuerpo de las que se obtiene el resultado de la prueba utilizando una muestra biológica. En un ejemplo, el antígeno está unido a un sustrato en un dispositivo, y el antígeno puede estar inmovilizado o de otro modo en contacto con un anticuerpo que está unido a un sustrato. El antígeno puede estar marcado de forma detectable o utilizarse en combinación con un anticuerpo de detección marcado de forma detectable. En ciertas modalidades, el control puede ser un isotipo o especie de origen diferente para un anticuerpo de captura o detección, en relación con el isotipo o especie de origen para un anticuerpo de captura o detección que se utiliza para analizar una muestra biológica.

En ciertas modalidades, los antígenos modificados y no modificados de la invención pueden modificarse utilizando cualquier enfoque adecuado bien conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a la adición de una o más etiquetas de purificación, tal como una etiqueta His. En una modalidad de ejemplo, una etiqueta His es una secuencia lineal de n residuos de histidina donde n es usualmente 6-10. Las etiquetas His consiguen la purificación uniéndose específicamente a iones de níquel o cobalto, los cuales pueden estar, por ejemplo, unidos a un sustrato, tal como cualquier perla adecuada. La etiqueta His, o cualquier otra etiqueta de purificación adecuada, puede colocarse en el extremo N o en el extremo C de la proteína o péptido. En otras modalidades, puede incluirse una etiqueta FLAG, un octapéptido FLAG o un epítipo FLAG, y las secuencias FLAG adecuadas son conocidas en la técnica. En ciertas modalidades, también puede utilizarse una etiqueta de modificador pequeño relacionado con ubiquitina (SUMO), tal como una etiqueta His-SUMO.

En otras modalidades de ejemplo de la invención, uno o más de los antígenos quiméricos de la divulgación también pueden comprender un enlazador como también sería bien conocido en la técnica. El término "enlazador" se refiere generalmente a una fracción química que conecta un segmento del antígeno quimérico a otro material, y los enlazadores adecuados pueden incluir aminoácidos y otros tipos de grupos enlazadores. En general, los

enlazadores de aminoácidos pueden estar compuestos principalmente por aminoácidos neutros relativamente pequeños, como Glicina, Serina y Alanina, y pueden incluir múltiples copias de una secuencia enriquecida en Glicina y Serina. En ciertas modalidades, el enlazador se proporciona como un medio para conectar el antígeno quimérico a un sustrato. Como tal,
5 el enlazador puede estar unido a un compañero de unión que conecta el antígeno a un sustrato. Ejemplos no limitativos de socios de unión incluyen estreptavidina y biotina.

En ciertas modalidades, los antígenos quiméricos de la invención pueden unirse a una matriz que incluye sustratos a los cuales pueden unirse los antígenos. El archivo adjunto puede o no ser a través de un enlazador. En diversas modalidades, los presentes antígenos
10 quiméricos pueden unirse de forma reversible o irreversible a un sustrato, por ejemplo, mediante unión covalente, iónica o física a un sustrato en fase sólida utilizando métodos como la unión covalente a través de un enlace amida o éster, atracción iónica o por adsorción. Como se ha indicado anteriormente, ejemplos no limitativos de dicha unión pueden comprender etiquetas de biotina y estreptavidina. El sustrato puede ser cualquier sustrato adecuado sobre
15 el que puedan fijarse uno o más de los antígenos quiméricos descritos en el presente documento. Algunos ejemplos son los sustratos utilizados habitualmente en ensayos de inmunodetección, dispositivos de flujo lateral, ensayos basados en microesferas, nanopartículas tal como las nanopartículas de oro, dispositivos microfluídicos, etc. Así, un sustrato sólido puede ser un sustrato sólido poroso que permite el flujo de líquido a través del
20 sustrato. El líquido puede fluir a través del sustrato poroso por cualquier medio adecuado, tal como la acción capilar, la microfluídica, etc. El sustrato también puede ser un sustrato sólido no poroso, tal como perlas formadas a partir de vidrio u otros materiales no porosos, como el plástico. En ciertas modalidades, el sustrato y los antígenos quiméricos pueden funcionalizarse para facilitar su unión. El sustrato puede bloquearse antes de fijar los
25 antígenos quiméricos para reducir los artefactos, y algunos ensayos también pueden realizarse en solución.

En ciertas modalidades, los antígenos quiméricos de la invención están presentes *in vitro*, tal como en un ensayo *in vitro* y están dispuestos de manera que permiten que los antígenos se pongan en contacto con una muestra biológica obtenida de un sujeto humano o
30 animal, tal como cualquier mamífero. Los sujetos representativos para los métodos de detección de la presente invención pueden incluir caninos y felinos, así como otros mamíferos que puedan tenerse como mascotas. En ciertas modalidades, la muestra biológica se obtiene de un animal que ha estado expuesto o se sospecha que ha estado expuesto, o corría el riesgo de estarlo, a la enfermedad de Chagas.

En ciertas modalidades, se obtiene un resultado basado en una determinación de la presencia, ausencia, cantidad, tipo, proporción o una combinación de los mismos para anticuerpos analizados utilizando un enfoque y/o un dispositivo de la presente divulgación y se fija en un medio tangible de expresión, tal como un archivo digital, y/o se guarda en un dispositivo de memoria portátil, o en un disco duro, o se comunica a un sistema de almacenamiento basado en la web o en la nube. La determinación puede comunicarse, por ejemplo, a un proveedor de servicios de salud veterinaria con el fin de que realice un diagnóstico y/o recomiende o no una intervención médica concreta.

Los antígenos quiméricos de la invención también pueden utilizarse en ensayos incluidos en kits de pruebas. Tales kits de prueba pueden incluir, por ejemplo, uno o más de los antígenos quiméricos descritos en el presente documento junto con materiales de detección para la identificación de la unión antígeno-anticuerpo descrita en el presente documento, y estos materiales pueden suministrarse en envases adecuados que identifiquen las pruebas que se realizarán. El kit puede estar provisto de reactivos adecuados para identificar anticuerpos de *T. cruzi* cuando se unen a los antígenos quiméricos, y el kit puede incluir medios para la recogida de muestras. El kit también puede suministrarse como componente de un cartucho o componente similar o, por ejemplo, de una placa de pocillos múltiples. Tales componentes pueden suministrarse precargados con cualquier combinación de reactivos necesarios para realizar el análisis descrito, incluyendo un sustrato adecuado y ciertos reactivos en forma liofilizada para su reconstitución en, por ejemplo, un tampón de inmunodiagnóstico adecuado. En diversas modalidades, los kits también pueden incluir material impreso, como la etiqueta o las instrucciones relativas a la modalidad de los ensayos utilizando los antígenos quiméricos de la presente divulgación. El material impreso puede formar parte del envase o de la etiqueta, y puede proporcionar además información que muestre o explique el contenido del kit, o esta información puede proporcionarse en el envase que incluye el kit.

Así pues, la presente invención se refiere a un antígeno quimérico IBMP modificado para su uso en la detección del parásito *Trypanosoma cruzi* en sujetos humanos y animales con mayor precisión y menos pruebas de falsos positivos. En este antígeno quimérico IBMP modificado, los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 se modifican para su uso en la detección de la presencia de *Trypanosoma cruzi* con el fin de diagnosticar la enfermedad de Chagas en un paciente humano o animal, y la modificación puede obtenerse insertando el péptido PEP2 y opcionalmente otros antígenos *T. cruzi* en los antígenos IBMP 8.1 y/o 8.3, y utilizando los anticuerpos modificados para detectar la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en pacientes

humanos y animales. Se utiliza un antígeno IBMP 8.4 junto con los antígenos 8.1 y 8.3 modificados. Los antígenos quiméricos modificados que incluyen los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados junto con IBMP 8.4 pueden utilizarse en un ensayo de flujo lateral u otros ensayos adecuados para la detección de *T. cruzi* y el diagnóstico en un paciente humano o animal de una infección por la enfermedad de Chagas. Los kits de prueba que emplean estos antígenos quiméricos también se proporcionan como se describe más adelante.

En un aspecto de ejemplo de la presente invención se proporciona un antígeno quimérico el cual comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y/o un antígeno IBMP 8.3 modificado, en donde cualquiera de los dos antígenos IBMP 8.1 y/o 8.3 modificados contienen por lo menos un antígeno PEP2 insertado en el mismo. El PEP2 puede insertarse en los antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y/o 8.3 en cualquier lugar adecuado donde complemente el efecto antigénico de la proteína IBMP y proporcione una prueba más precisa y sensible para detectar la presencia de antígenos de *T. cruzi* en pacientes humanos y animales. Las inserciones de PEP2 pueden estar en una variedad de ubicaciones, como en muchas de las regiones específicas de los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 descritas en el presente documento. A continuación se proporcionan ejemplos específicos en donde el antígeno IBMP 8.1 modificado tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NOS: 1 o 2, y se proporcionan otros ejemplos adecuados en donde el antígeno IBMP 8.3 modificado de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6. También son posibles otras formas adecuadas de inserción de PEP2 dentro de la presente invención, como comprenderían las personas normalmente versadas en la técnica. En estas modalidades, los antígenos 8.1 y 8.3 IBMP modificados pueden contener un antígeno PEP2 o una pluralidad de antígenos PEP2 según sea necesario para maximizar la utilidad de estos antígenos en la formación de un ensayo de prueba eficiente y altamente preciso para anticuerpos de *T. cruzi* e infecciones de la enfermedad de Chagas en pacientes humanos y animales.

En otra modalidad de ejemplo, se proporciona un antígeno quimérico para diagnosticar una infección de la enfermedad de Chagas, en donde el antígeno quimérico comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y un antígeno IBMP 8.3 modificado, en donde los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados contienen por lo menos un antígeno PEP2. Como se indica más adelante, en la composición antigénica de la invención, esta construcción también puede incluir un antígeno IBMP 8.4 no modificado en combinación con los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados como se describe en el presente documento.

En una modalidad de ejemplo adicional de la presente invención, se proporciona un antígeno quimérico para su uso en el diagnóstico de una infección de la enfermedad de Chagas que comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y/o un antígeno IBMP 8.3 modificado, y los antígenos 8.1 y/o 8.3 modificados incluyen por lo menos un antígeno PEP2 como se ha expuesto anteriormente y también pueden combinarse con un antígeno IBMP 8.4 no modificado. En determinadas modalidades, el antígeno IBMP 8.4 tendrá la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

En otra modalidad de ejemplo, puede proporcionarse el antígeno quimérico de la invención para su uso en el diagnóstico de una infección de la enfermedad de Chagas el cual comprende un antígeno IBMP 8.1 modificado y un antígeno IBMP 8.3 modificado, en donde los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados contienen por lo menos un antígeno PEP2 y un segundo antígeno de *T. cruzi*, tal como un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígenos 1F8, rTc24 (PGR24-His), TcF, SAPA, TSSA, SAPA/TSSA, SAPA/TSSA, FRA, B13, MACH (PEP2, TcD, TcE, SAPA), TcD, y TcE. En ciertas modalidades, el segundo antígeno tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 11-14. En otras modalidades, el antígeno quimérico puede comprender antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados y un antígeno IBMP 8.4 no modificado, en donde los antígenos IBMP 8.1 y 8.3 modificados contienen por lo menos un antígeno PEP2 y un segundo antígeno seleccionado del grupo que consiste en 1F8 rTc24 (PGR24-His).3 modificados contienen por lo menos un antígeno PEP2 y un segundo antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígenos 1F8, rTc24 (PGR24-His), TcF, SAPA, TSSA, SAPA/TSSA, SAPA/TSSA, FRA, B13, MACH (PEP2, TcD, TcE, SAPA), TcD, y TcE. Como se indicó anteriormente, el antígeno IBMP 8.1 modificado puede tener la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 1 o 2, y el antígeno IBMP 8.3 modificado puede tener una secuencia de aminoácidos tal como las SEQ ID NOS: 3-6. En determinadas modalidades, el antígeno a PEP2 puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

En otra modalidad de ejemplo de la presente invención, se proporciona un inmunoensayo para detectar anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* el cual comprende el antígeno quimérico según se describió anteriormente el cual incluye un antígeno 8.1 y/o 8.3 modificado que contenga un antígeno a PEP2 insertado en el mismo junto con reactivos de detección de inmunounión los cuales proporcionan una señal que indica inmunounión cuando un anticuerpo contra *Trypanosoma cruzi* se une con dicho antígeno quimérico. Tal inmunoensayo puede seleccionarse del grupo que consiste en el inmunoensayo de flujo lateral, el ensayo de transferencia de múltiples antígenos, el ensayo de inmunoadsorción

enzimática (ELISA) directo o indirecto, el inmunoensayo enzimático, el ensayo intercalado, el ensayo de electroquimioluminiscencia, el inmunoensayo por tira reactiva y el ensayo radioisotópico.

En una modalidad alternativa, el antígeno quimérico del inmunoensayo puede construirse para incluir un antígeno 8.1 y/o 8.3 modificado que contenga un antígeno PEP2 insertado en el mismo junto con un antígeno IBMP 8.4 no modificado. A continuación, este antígeno quimérico puede combinarse con reactivos de detección de inmunounión que proporcionan una señal que indica inmunounión cuando un anticuerpo contra *Trypanosoma cruzi* se une con dicho antígeno quimérico para formar un inmunoensayo adecuado de acuerdo con la invención. El inmunoensayo puede ser un inmunoensayo de flujo lateral o cualquiera de los inmunoensayos convencionales conocidos en la técnica. En uso, el inmunoensayo se utiliza para recibir una muestra de un fluido corporal u otra matriz biológica de un sujeto o paciente humano o animal que se somete a determinar si los anticuerpos contra *T. cruzi* están presentes, y la muestra se desplazará a través del inmunoensayo hasta una región de detección que incluye los reactivos de inmunounión como se ha expuesto anteriormente que pueden generar una señal indicativa de la unión de los antígenos en el inmunoensayo con anticuerpos de *T. cruzi* que están presentes en la muestra.

En otras modalidades adecuadas, los reactivos de detección de inmunounión del inmunoensayo de la invención pueden comprender aquellos reactivos que generan una señal que indica inmunounión cuando un anticuerpo contra *Trypanosoma cruzi* se une con dicho antígeno quimérico. La señal utilizada en el presente inmunoensayo puede ser cualquier material apropiado que proporcione una identificación visual o de otro tipo que indique que se ha producido la inmunounión y que los anticuerpos contra *T. cruzi* están presentes en la muestra del sujeto. La señal en sí puede ser cualquier señal convencional utilizada en ensayos de diagnóstico, incluida una señal seleccionada del grupo que consiste en una señal colorimétrica, una señal fluorescente, una señal quimioluminiscente, una señal radiactiva y una señal visual.

En una modalidad de ejemplo, el presente inmunoensayo será un inmunoensayo de flujo lateral capaz de detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, y este ensayo de flujo lateral puede incluir los antígenos quiméricos modificados como se establece anteriormente, con o sin los antígenos quiméricos no modificados también descritos en el presente documento. En ciertas modalidades, el antígeno quimérico modificado utilizado en el inmunoensayo de flujo lateral de la invención puede ser un antígeno

quimérico IBMP 8.1 y/o un antígeno quimérico IBMP 8.3 modificado que se modifica agregando por lo menos un antígeno PEP2. En otras modalidades, el antígeno quimérico modificado en este inmunoensayo de flujo lateral puede ser un antígeno quimérico IBMP 8.1 y/o un antígeno quimérico IBMP 8.3 modificado que incluyen cada uno por lo menos un antígeno PEP2 insertado en el mismo combinado con un antígeno quimérico IBMP 8.4 no modificado como se describe más adelante. En otras modalidades, además del antígeno PEP2, los antígenos quiméricos modificados de la invención también pueden incluir un segundo antígeno *T. cruzi*, incluyendo aquellos antígenos seleccionados del grupo que consiste en antígenos 1F8, rTc24 (PGR24-His), TcF, SAPA, TSSA, SAPA/TSSA, SAPA/TSSA, FRA, B13, MACH (PEP2, TcD, TcE, SAPA), TcD, y TcE.

En otra modalidad de ejemplo de la invención, se proporciona un método de inmunoensayo para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en un sujeto humano o animal en donde el método de inmunoensayo comprende proporcionar el antígeno quimérico modificado descrito anteriormente el cual contiene por lo menos un antígeno PEP2 insertado en un antígeno quimérico IBMP 8.1 modificado y/o un antígeno quimérico IBMP 8.3 modificado. El antígeno quimérico modificado de la invención se utilizará para determinar si un paciente humano o animal da positivo para la presencia de anticuerpos *T. cruzi*, por lo que se obtiene una muestra del paciente humano o animal para utilizar el método. Se obtiene una muestra adecuada a partir de un fluido corporal u otra matriz biológica del paciente, y esta muestra se pone en contacto con el antígeno quimérico modificado como se ha descrito anteriormente. En un método de ejemplo, la detección de anticuerpos *T. cruzi* se lleva a cabo al poner en contacto dicha muestra con dicho antígeno quimérico modificado de la invención; y después determinar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* al detectar inmunounión de dicho antígeno quimérico a *Trypanosoma cruzi* en dicha muestra.

En una modalidad alternativa, los antígenos 8.1 y 8.3 modificados pueden combinarse con un antígeno IBMP 8.4 no modificado en la composición antigénica quimérica utilizada en el método de inmunoensayo de la presente invención. Este método de inmunoensayo puede llevarse a cabo de cualquier forma adecuada, tal como un inmunoensayo seleccionado del grupo que consiste en inmunoensayo de flujo lateral, ensayo de transferencia de múltiples antígenos, ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) directo o indirecto, inmunoensayo enzimático, ensayo intercalado, ensayo de electroquimioluminiscencia, el inmunoensayo por tira reactiva y ensayo radioisotópico.

En otra modalidad de ejemplo, los antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y 8.3 pueden utilizarse en un método de diagnóstico de una infección por la enfermedad de Chagas en un sujeto humano o animal. En tal método, se proporcionan los antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y 8.3 descritos anteriormente, en donde cada uno de dichos antígenos quiméricos contiene por lo menos un antígeno PEP2 incorporado. En este método de ejemplo, se obtiene una muestra de un paciente humano o animal, tal como un fluido corporal u otra matriz biológica, y esta muestra se pone en contacto con el antígeno quimérico modificado de la invención, tal como en una tira de prueba en un inmunoensayo; tal como un inmunoensayo de flujo lateral. En virtud del contacto de la muestra con el antígeno quimérico modificado de la invención, se determina la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* mediante la detección de la inmunounión del antígeno quimérico a anticuerpos de *Trypanosoma cruzi* en la muestra, y la presencia de tales anticuerpos es indicativa de que el paciente humano o animal está infectado con la enfermedad de Chagas. Como se ha indicado anteriormente, tal método puede llevarse a cabo como un inmunoensayo de flujo lateral, pero pueden emplearse otras numerosas formas de inmunoensayos, incluidos los ensayos de transferencia de múltiples antígenos, los ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA) directos o indirectos, los inmunoensayos enzimático, los ensayos intercalados, los ensayos de electroquimioluminiscencia, los inmunoensayos por tira reactiva y los ensayos radioisotópicos.

También se proporciona un método de inmunoensayo alternativo para detectar o diagnosticar una infección de la enfermedad de Chagas en un sujeto humano o animal, en donde los antígenos quiméricos modificados utilizados incluyen un antígeno IBMP 8.1 modificado y un antígeno 8.3 modificado, ambos de los cuales incluirán antígenos PEP2 implantados en los mismos, y también incluirán un antígeno IBMP 8.4 no modificado. Como en el método descrito anteriormente, se proporciona el antígeno quimérico modificado, tal como en una tira de prueba, y se obtiene una muestra de fluido corporal u otra matriz biológica de un sujeto humano o animal y se pone en contacto con este antígeno quimérico modificado. Cualquier inmunounión resultante al antígeno refleja que hay anticuerpos *T. cruzi* en la muestra y que el ser humano o el animal que se está analizando está infectado con la enfermedad de Chagas. La inmunounión de dicho antígeno quimérico a *Trypanosoma cruzi* en dicha muestra puede determinarse mediante cualquier reactivo adecuado que pueda emitir un observable.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una tira de prueba que puede utilizarse para determinar cualitativamente la presencia o ausencia de anticuerpos contra

Trypanosoma cruzi que serán indicativos de una infección por la enfermedad de Chagas. Tal tira de prueba puede estar hecha de una membrana de nitrocelulosa o de otros materiales los cuales permitan el flujo a través de la tira de prueba, tal como por ejemplo por acción capilar, de modo que una muestra en un extremo de la tira migre a través de la tira en donde la muestra pueda entrar en contacto con los antígenos quiméricos modificados de la invención, y de modo que haya una zona de detección en la tira de prueba en donde se produzca una señal que refleje que se ha producido la inmunounión entre los antígenos quiméricos modificados de la tira de prueba y los anticuerpos de la muestra. Como se ha indicado anteriormente, la composición antigénica utilizada en dicha tira de prueba puede comprender un antígeno IBMP 8.1 modificado y un antígeno IBMP 8.3 modificado que incluyen ambos por lo menos un antígeno PEP2 insertado en el mismo. Estos dos antígenos también pueden combinarse con un antígeno quimérico IBMP 8.4 no modificado en la composición antigénica utilizada en la presente invención. Tales tiras reactivas pueden utilizarse solas o en casetes u otros dispositivos en donde pueden utilizarse varias tiras reactivas al mismo tiempo.

En otra modalidad de ejemplo de la presente invención, se proporciona un dispositivo de inmunoensayo para realizar un inmunoensayo de anticuerpos contra *T. cruzi* en un sujeto humano o animal. El dispositivo comprende una tira de prueba que está previamente recubierta con el antígeno quimérico modificado de la invención que comprende los antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y 8.3, cada uno de los cuales tiene uno o más antígenos PEP2 insertados en el mismo. En ciertas modalidades, la mezcla antigénica de la tira de prueba del dispositivo también puede incluir un antígeno quimérico IBMP 8.4. Este dispositivo de inmunoensayo de la invención también incluye un reactivo de detección que detecta la unión entre dichos antígenos quiméricos modificados en la tira de prueba y un anticuerpo contra *T. cruzi* localizado en una muestra de fluido corporal u otra matriz biológica obtenida de un sujeto humano o animal. La tira de prueba puede estar compuesta por una membrana de nitrocelulosa, u otros materiales adecuados bien conocidos en el campo que se utilizan que experimentan una acción capilar o de mecha de modo que cuando se introduce un fluido en un extremo de la tira de prueba, ese fluido fluirá lateralmente hacia arriba por la tira de prueba de modo que cualquier anticuerpo de la muestra pueda combinarse con el antígeno quimérico modificado pre-recubierto como se describe en el presente documento. En una modalidad, los reactivos de detección generan una señal que indica que se ha detectado la unión de los anticuerpos de la muestra y los antígenos de la tira de prueba. Tal señal puede ser cualquier señal adecuada que pueda observarse visualmente o de otra forma, y tales señales pueden incluir una señal colorimétrica, una señal fluorescente, una señal quimioluminiscente, una señal radiactiva y una señal visual.

En otras modalidades de la presente invención, se proporciona un kit de prueba para detectar cualitativamente la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en una muestra de fluido corporal u otra matriz biológica de un humano o animal el cual comprende un antígeno quimérico modificado como se describe en el presente documento
5 que comprende antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y 8.3 que tienen uno o más antígenos PEP2 insertados en el mismo. En otras modalidades, también puede utilizarse el antígeno quimérico IBMP 8.4.

En una modalidad, además del antígeno quimérico modificado como se ha descrito anteriormente, el kit de prueba también una tira de prueba en donde se pueden localizar los
10 antígenos y reactivos de detección de inmunounión que se pueden agregar a la tira de prueba con el fin de proporcionar una señal indicativa de inmunounión de dicho antígeno quimérico cuando la muestra contiene anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*. En ciertas modalidades, la tira de prueba tendrá una zona de detección particular incluida en la misma en donde se puede observar la señal indicativa de la inmunounión de dicho antígeno quimérico en la tira
15 de prueba y los anticuerpos de *Trypanosoma cruzi* en la muestra. El kit también puede incluir dispositivos como un hisopo que recogen la muestra de un paciente que se va a analizar, y la muestra puede ser un fluido corporal u otra matriz biológica del paciente. Las muestras adecuadas pueden ser un fluido corporal, suero, sangre entera, saliva y/u otras matrices biológicas. En el funcionamiento del kit de prueba, se obtiene una muestra de un paciente
20 humano o animal sometido a prueba, por ejemplo mediante un bastoncillo de algodón u otro dispositivo adecuado, y la muestra puede colocarse en una solución tampón que también puede incluirse en el kit de prueba. Una vez obtenida la muestra y colocada en la solución tampón, se aplica una cierta cantidad de la solución a la tira de prueba para que el fluido migre desde el punto de aplicación a través de la tira de prueba, de modo que pueda mezclarse con
25 los antígenos quiméricos modificados en la tira de prueba, y alcanzar entonces una zona de detección en donde se genera (o no se genera) una señal que refleja la presencia o ausencia de anticuerpos *T. cruzi* en la muestra obtenida del paciente.

Aún más, la invención proporciona un sistema de inmunoensayo para detectar cualitativamente la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en un
30 sujeto humano o animal que comprende los antígenos quiméricos modificados 8.1 y 8.3 anteriores, con o sin un antígeno 8.4 IBMP no modificado. Estos antígenos pueden localizarse en una tira de prueba a la que se aplica una muestra de fluido corporal u otra matriz biológica del sujeto humano o animal que pueda aplicarse a dicha tira de prueba. El sistema también incluye un reactivo de detección de inmunounión que normalmente estará situado en dicha

tira de prueba y el cual proporciona una señal que indica inmunounión de los antígenos cuando la muestra contiene anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, y hay una zona de detección en dicha tira de prueba en donde se puede observar la señal indicativa de inmunounión entre los antígenos de la tira de prueba y los anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*. La señal generada en virtud de la inmunounión puede seleccionarse del grupo que consiste en una señal colorimétrica, una señal fluorescente, una señal quimioluminiscente, una señal radiactiva y una señal visual. La tira de prueba puede estar hecha de una membrana de nitrocelulosa, pero también puede ser de cualquier material adecuado el cual experimente una acción capilar, de modo que una muestra fluida pueda migrar lateralmente a través de la tira de prueba y que los anticuerpos de la muestra puedan unirse a los antígenos de la tira de prueba.

Los antígenos, composiciones, métodos, sistemas, tiras reactivas, kits y otros aspectos de la presente invención que utilizan el antígeno quimérico modificado como se describe en el presente documento para la determinación cualitativa de la presencia del parásito *T. cruzi* que causa la enfermedad de Chagas en humanos y animales se describen con más detalle en el presente documento.

EJEMPLOS:

La invención se describirá con más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO 1

En una modalidad adecuada de la presente invención, los antígenos quiméricos IBMP 8.1 y/o IBMP 8.3 modificados se incorporarán en un inmunoensayo de diagnóstico tal como un ensayo de flujo lateral. Dicho ensayo puede usarse para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* y puede comprender los antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y/o 8.3 que se modifican para contener un antígeno PEP2 insertado en los mismos. El ensayo también puede incluir reactivos de detección de inmunounión adecuados los cuales proporcionan una señal que indica inmunounión cuando un anticuerpo contra *Trypanosoma cruzi* se une con dichos antígenos quiméricos modificados. Además de los antígenos IBMP 8.1 y/o 8.3 modificados descritos anteriormente, la composición antigénica de la invención también puede incluir el antígeno IBMP 8.4 no modificado, como el que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 descrita en el presente documento. En cualquier caso, la composición de antígeno quimérico modificado de la invención puede

combinarse con reactivos de detección de inmunounión que proporcionan una señal que indica inmunounión cuando un anticuerpo contra *Trypanosoma cruzi* se une con dicho antígeno quimérico para formar un inmunoensayo adecuado de acuerdo con la invención. Estos ensayos se utilizan obteniendo una muestra de un fluido corporal u otra matriz biológica de un sujeto o paciente humano o animal que se somete a pruebas para determinar si los anticuerpos contra *T. cruzi* están presentes, y la muestra se desplazará a través del inmunoensayo hasta una región de detección que incluye los reactivos de inmunounión según lo establecido anteriormente, los cuales pueden generar una señal indicativa de la unión de los antígenos en el inmunoensayo con anticuerpos de *T. cruzi* que están presentes en la muestra.

En un ejemplo de ejemplo de la invención, se proporciona un ensayo de flujo lateral como se muestra en la Fig. 1 que contiene la composición de antígeno quimérico modificado como se ha identificado anteriormente. En tal ejemplo, la composición antigénica comprende los antígenos quiméricos IBMP-8.1 y/o IBMP-8.3 modificados de *T. cruzi* se utilizarán en tiras de ensayo, tales como las hechas de una membrana de nitrocelulosa, y los antígenos se dispensan en paralelo con el control de reacción del ensayo en las tiras de ensayo como parte de una plataforma de inmunocromatografía de flujo lateral. En una prueba de ejemplo, el ensayo comprende una tira multimembrana dispuesta secuencialmente en una tarjeta adhesiva que contiene una almohadilla de muestra, una almohadilla de conjugado, la composición de antígeno quimérico, una membrana de nitrocelulosa impregnada de control y una membrana residual o mecha. La tira de prueba del ensayo de la invención puede colocarse dentro de un dispositivo como un casete de plástico en donde tiene lugar la reacción después de obtener una muestra de un paciente humano o animal, combinarla con un tampón y aplicarla sobre la tira de prueba.

En un ejemplo adecuado, el dispositivo de la invención contiene una abertura para dispensar la muestra/tampón de corrida en una porción de la tira de prueba, y una ventana de visualización de la reacción en el punto en donde puede aparecer una señal que refleje la inmunounión. En un ejemplo de ejemplo, se dispensan de uno a cinco (1-5) microlitros de la muestra en la abertura del lado de dispensación, seguidos de la adición de 1 -3 gotas de tampón de corrida para permitir que el líquido de la muestra fluya a lo largo de la tira de prueba. La mezcla migra por acción capilar, eluyendo el conjugado a una zona de prueba donde se encuentran los antígenos impregnados en la tira de prueba. El exceso de componentes migra hacia el extremo opuesto de la tira, donde quedan retenidos mediante una almohadilla de mecha u otro agente secante, como se muestra en la Fig. 1. Los resultados de las pruebas

de inmunoensayo pueden obtenerse de varias maneras en función de la señal generada por los reactivos de inmunounión, y tales señales pueden ser visuales para que sean fácilmente observables por el clínico que administra la prueba. En un ejemplo adecuado, los resultados pueden aparecer visualmente para el clínico después de 5-10 minutos tras la dispensación de la muestra a temperatura ambiente (promedio 22 °C), pero también puede obtenerse de diversas formas adecuadas, como por ejemplo adquiriendo una imagen fotográfica digital de la zona de detección. En ciertas modalidades, los resultados positivos pueden caracterizarse por la presencia de señal colorimétrica, por ejemplo, bandas de color gris-verde en la línea de prueba que contiene los antígenos quiméricos identificados anteriormente (por ejemplo, los antígenos IBMP 8.1 y/o 8.3 modificados, de forma óptima con el antígeno IBMP-8.4). Puede proporcionarse otra señal colorimétrica como control, tal como un control rojo el cual garantice que la muestra ha migrado lo suficiente a través de la tira de prueba. En un ejemplo adecuado, tras la prueba, la línea de control roja que aparece sola indicará una prueba negativa, en el cual la presencia de la línea gris-verde además de la línea de control roja indicará un resultado positivo de la prueba.

EJEMPLO 2

De acuerdo con la presente invención, se preparan antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y/o IBMP 8.3 en donde se insertan uno o más antígenos PEP2 en ubicaciones adecuadas tanto en los antígenos IBMP 8.1 como 8.3 que mejorarán la precisión y sensibilidad de las pruebas de inmunoensayo para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*. En ciertas modalidades específicas, hay un antígeno PEP2 insertado en el antígeno quimérico 8.1 y/o 8.3, y en otras modalidades, hay dos o más antígenos PEP2.

Por ejemplo, con respecto al antígeno quimérico modificado, en ciertas modalidades, el antígeno 8.1 modificado de la invención puede tener la siguiente secuencia que refleja la inserción de dos antígenos PEP2 en el antígeno quimérico:

MGSSHHHHHGSEEGSRGDSSMPASASEEGSRGDSSMPAKAAIAPAKAAAAPAK
AAAAPAAEPKSAEPKPAEPKSGDKPSPFGQAAA
GDKPSPFGQAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQ

A.. (SEQ ID NO: 1)

En otra modalidad de ejemplo, el antígeno 8.1 puede tener la siguiente secuencia que refleja la inserción de un antígeno PEP2 en el antígeno quimérico:

MGSSHHHHHHGSEEGSRGDSSMPASASEEGSRGDSSMPAKAAIAPAKAAAAPAK
AAAAPAAEPKSAEPKPAEPKSGDKPSPFGQAAA
GDKPSPFGQAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQA (SEQ ID NO: 2).

En ambos casos, el antígeno IBMP 8.1 modificado puede combinarse con un antígeno IBMP 8.3 modificado como se describe en el presente documento, opcionalmente junto con un antígeno quimérico IBMP 8.4 no modificado, y el antígeno quimérico modificado de acuerdo con la invención puede utilizarse en métodos de diagnóstico e inmunoensayos mejorados utilizados para la determinación de la presencia de anticuerpos *T. cruzi* en un sujeto humano o animal.

EJEMPLO 3

De acuerdo con la presente invención, se preparan antígenos quiméricos modificados IBMP 8.1 y/o IBMP 8.3 en donde se insertan uno o más antígenos PEP2 en ubicaciones adecuadas tanto en los antígenos IBMP 8.1 como 8.3 que mejorarán la precisión y sensibilidad de las pruebas de inmunoensayo para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*. En ciertas modalidades específicas, hay un antígeno PEP2 insertado en el antígeno quimérico 8.1 y/o 8.3, y en otras modalidades, hay dos o más antígenos PEP2.

Por ejemplo, con respecto al antígeno quimérico modificado, en ciertas modalidades, el antígeno 8.3 modificado de la invención puede tener la siguiente secuencia que refleja la inserción de un antígeno PEP2 en el antígeno quimérico:

MGSSHHHHHHGPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPA
EKVAEAEKQKAAEATKVAEAEKQRAAEATKVAE
AEKQKAAEATPAKAAAPPAKAAAPPAKAAAPPAKAAAPPAKAAAPPAKAAAPPAKAA
AAPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDKP.. (SEQ ID NO: 3)

En otras modalidades de ejemplo, el antígeno 8.3 modificado de la invención puede tener dos o más antígenos PEP2 insertados en el antígeno quimérico IBMP como se muestra en las siguientes secuencias de ejemplo:

MGSSHHHHHHGPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPA
EKVAEAEKQKAAEATKVAEAEKQRAAEATKVAE
GDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAEKQKAAEATPAKAAAPPKAAAPPKAAAPPA
KAAAPPKAAAPPKAAAPPKAAAPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQ
AAAGDKP.. (SEQ ID NO: 4)

MGSSHHHHHHGPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPA
EKVAEAEKQKAAEATKVAEAEKQRAAEATKVAE
GDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAEKQKAAEAT
PAKAAAPPKAAAPPKAAAPPKAAAPPKAAAPPKAAAPPKAAAPSPFGQAA
AGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDKP.. (SEQ ID NO: 5)

MGSSHHHHHHGPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPAEPKPA
EKVAEAEKQKAAEATKVAEAEKQRAAEATKVAE
GDKPSPFGQAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQA
AEKQKAAEATPAKAAAPPKAAAPPKAAAPPKAAAPPKAAAPPKAAAPPKAA
AAPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDKP.. (SEQ ID NO: 6)

En todas las modalidades específicas anteriores, los antígenos IBMP 8.3 modificados pueden combinarse con un antígeno IBMP 8.1 modificado como se describe en el presente documento, opcionalmente junto con un antígeno quimérico IBMP 8.4 no modificado, y el antígeno quimérico modificado de acuerdo con la invención puede usarse en métodos de diagnóstico e inmunoensayos mejorados usados para la determinación de la presencia de anticuerpos *T. cruzi* en un sujeto humano o animal.

La información relativa a las secuencias aquí divulgadas se resume en el siguiente formulario. Además, con este documento se adjunta una versión electrónica ST26 xml de este listado de secuencias.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Vida Pharmacal Inc.

<120> ANTÍGENOS QUIMÉRICOS MODIFICADOS 8.1 Y 8.3 PARA LA DETECCIÓN DE
TRYPANOSOMA CRUZI

<130> P12724US00/BAS

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 141

<212> PRT

<213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 1

Met	Gly	Ser	Ser	His	His	His	His	His	His	Gly	Ser	Glu	Glu	Gly	Ser
1				5					10					15	

Arg	Gly	Asp	Ser	Ser	Met	Pro	Ala	Ser	Ala	Ser	Glu	Glu	Gly	Ser	Arg
			20					25					30		

Gly	Asp	Ser	Ser	Met	Pro	Ala	Lys	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro	Ala	Lys	Ala
		35					40					45			

Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Glu	Pro	Lys
	50					55				60					

Ser	Ala	Glu	Pro	Lys	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Lys	Pro	Ser
65					70					75				80	

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

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

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

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

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 2

Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Ser Glu Glu Gly Ser
1 5 10 15

Arg Gly Asp Ser Ser Met Pro Ala Ser Ala Ser Glu Glu Gly Ser Arg
20 25 30

Gly Asp Ser Ser Met Pro Ala Lys Ala Ala Ile Ala Pro Ala Lys Ala
35 40 45

Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Glu Pro Lys
50 55 60

Ser Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser Gly Asp Lys Pro Ser
65 70 75 80

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

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

Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala
115

<210> 3

<211> 183

<212> PRT

<213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 3

Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Pro Lys Pro Ala Glu
1 5 10 15

Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro
20 25 30

Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys
35 40 45

Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln
50 55 60

Lys Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Arg Ala
65 70 75 80

Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu
85 90 95

Ala Thr Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro
100 105 110

Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
115 120 125

Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala
130 135 140

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

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

Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro
180

<210> 4

<211> 205

<212> PRT

<213> *Trypanosoma cruzi*

<400> 4

Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Pro Lys Pro Ala Glu
1 5 10 15

Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro
20 25 30

Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys
35 40 45

Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln
50 55 60

Lys Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Arg Ala
65 70 75 80

Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly
85 90 95

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

Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro
115 120 125

Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys
130 135 140

Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala
145 150 155 160

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

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

Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro
195 200 205

<210> 5

<211> 227

<212> PRT

<213> Trypanosoma cruzi <400> 5

Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Pro Lys Pro Ala Glu
1 5 10 15

Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro
20 25 30

Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys
35 40 45

Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln
50 55 60

Lys Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Arg Ala
65 70 75 80

Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly
85 90 95

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

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

Phe Gly Gln Ala Ala Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala
 130 135 140

Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala
 145 150 155 160

Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala
 165 170 175

Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Ser
 180 185 190

Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln
 195 200 205

Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly
 210 215 220

Asp Lys Pro
 225

<210> 6
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma cruzi
 <400> 6

Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Pro Lys Pro Ala Glu
 1 5 10 15

Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro
 20 25 30

Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys
 35 40 45

Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln
 50 55 60

Lys Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Arg Ala
 65 70 75 80

Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly
 85 90 95

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

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

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

Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys
165 170 175

Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala
180 185 190

Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala
195 200 205

Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys
210 215 220

Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro
225 230 235

<210> 7
<211> 22
<212> PRT
<213> Trypanosoma cruzi

<400> 7

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

Ser Pro Phe Gly Gln Ala
20

<210> 8
<211> 264
<212> PRT
<213> Trypanosoma cruzi

<400> 8

Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Asp Ser Thr Ala His

1 5 10 15

Gly Thr Pro Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro Ser
 20 25 30

Thr Pro Ala Lys Phe Ala Glu Leu Leu Glu Gln Gln Lys Asn Ala Gln
 35 40 45

Phe Pro Gly Lys Glu Pro Lys Ser Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro
 50 55 60

Lys Ser Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Ser Ser
 85 90 95

Met Pro Ala Ser Ala Ser Glu Glu Gly Ser Arg Gly Asp Ser Ser Met
 100 105 110

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

Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln
 130 135 140

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

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

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

Ala Asp Val Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Lys Ala Ala
 195 200 205

Ile Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala
 210 215 220

Pro Ala Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His
 225 230 235 240

Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Thr Gln Asp Ala Tyr Arg Pro
 245 250 255

Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg
260

<210> 9
<211> 97
<212> PRT
<213> Trypanosoma cruzi

<400> 9

Met Gly Ser Ser His His His His His Gly Ser Glu Glu Gly Ser
1 5 10 15

Arg Gly Asp Ser Ser Met Pro Ala Ser Ala Ser Glu Glu Gly Ser Arg
20 25 30

Gly Asp Ser Ser Met Pro Ala Lys Ala Ala Ile Ala Pro Ala Lys Ala
35 40 45

Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Glu Pro Lys
50 55 60

Ser Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser Gly Asp Lys Pro Ser
65 70 75 80

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

Ala

<210> 10
<211> 161
<212> PRT
<213> Trypanosoma cruzi

<400> 10

Met Gly Ser Ser His His His His His Gly Pro Lys Pro Ala Glu
1 5 10 15

Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro
20 25 30

Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys
35 40 45

Pro Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln
50 55 60

Lys Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Arg Ala
65 70 75 80

Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu
85 90 95

Ala Thr Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro
100 105 110

Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
115 120 125

Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala
130 135 140

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

Pro

<210> 11
<211> 879
<212> PRT
<213> Trypanosoma cruzi

<400> 11

Met Gly Arg Thr Val Val Gly Ala Ser Arg Met Phe Trp Leu Thr His
1 5 10 15

Phe Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Cys Pro Ser Glu Pro Ala His Ala
20 25 30

Leu Ala Pro Gly Ser Ser Arg Val Glu Leu Phe Lys Arg Gln Asn Ser
35 40 45

Thr Val Pro Phe Glu Glu Asn Gly Glu Val Arg Gln Arg Val Val His
50 55 60

Ser Phe Arg Leu Pro Ala Leu Val Asn Val Asp Gly Val Met Val Ala
65 70 75 80

Ile Ala Asp Ala Arg Tyr Asp Thr Ser Asn Asp Asn Ser Leu Ile Asp
85 90 95

Lys Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Arg Ala
65 70 75 80

Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu
85 90 95

Ala Thr Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro
100 105 110

Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
115 120 125

Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala
130 135 140

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

Pro

<210> 11
<211> 879
<212> PRT
<213> Trypanosoma cruzi

<400> 11

Met Gly Arg Thr Val Val Gly Ala Ser Arg Met Phe Trp Leu Thr His
1 5 10 15

Phe Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Cys Pro Ser Glu Pro Ala His Ala
20 25 30

Leu Ala Pro Gly Ser Ser Arg Val Glu Leu Phe Lys Arg Gln Asn Ser
35 40 45

Thr Val Pro Phe Glu Glu Asn Gly Glu Val Arg Gln Arg Val Val His
50 55 60

Ser Phe Arg Leu Pro Ala Leu Val Asn Val Asp Gly Val Met Val Ala
65 70 75 80

Ile Ala Asp Ala Arg Tyr Asp Thr Ser Asn Asp Asn Ser Leu Ile Asp
85 90 95

Pro Leu Asn Phe Lys Gly Trp Trp Leu Arg Asp Arg Leu Asn Leu Trp
 340 345 350

Leu Thr Asp Asn Gln Arg Ile Tyr Asn Val Gly Gln Leu Ser Ile Gly
 355 360 365

Asp Glu Asn Ser Ala Tyr Ser Ser Val Leu Tyr Lys Asp Asp Lys Leu
 370 375 380

Tyr Cys Leu His Glu Ile Asn Ser Asn Glu Val Tyr Ser Leu Val Phe
 385 390 395 400

Ala Arg Leu Val Gly Glu Leu Arg Ile Ile Lys Ser Val Leu Gln Ser
 405 410 415

Trp Lys Lys Trp Asp Ser His Leu Ser Ser Ile Cys Thr Pro Ala Asp
 420 425 430

Pro Ala Ala Ser Ser Ser Glu Arg Val Cys Gly Pro Ala Val Thr Thr
 435 440 445

Val Gly Leu Ala Gly Phe Leu Ser His Ser Ala Asn Lys Thr Lys Trp
 450 455 460

Lys Asp Ala Tyr Arg Cys Val Asp Ala Ser Thr Ala Asn Ala Glu Arg
 465 470 475 480

Val Ser Asn Gly Leu Lys Phe Ala Gly Val Gly Gly Gly Ala Leu Trp
 485 490 495

Pro Val Ser Gln Gln Gly Gln Asn Gln Arg Tyr Arg Phe Ala Asn His
 500 505 510

Ala Phe Thr Leu Val Ala Ser Val Thr Ile His Glu Ala Pro Ser Val
 515 520 525

Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ala Ser Leu Asp Ser Ser Gly Gly Lys Lys
 530 535 540

Leu Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Glu Lys His Gln Trp Gln Pro Ile Tyr
 545 550 555 560

Gly Ser Thr Pro Val Thr Pro Thr Gly Ser Trp Glu Thr Gly Lys Arg
 565 570 575

Tyr His Val Val Leu Thr Met Ala Asn Arg Asn Gly Ser Val Tyr Val
 580 585 590

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

Thr Pro Asp Ile Ser His Phe Tyr Val Gly Gly Tyr Gly Arg Ser Asp
 610 615 620

Met Pro Thr Ile Ser His Val Thr Val Asn Asn Val Leu Leu Tyr Asn
 625 630 635 640

Arg Gln Leu Asn Ala Glu Glu Ile Lys Thr Leu Phe Leu Ser Gln Asp
 645 650 655

Leu Ile Gly Thr Glu Ala His Met Asp Ser Ser Ser Asp Ser Ser Ala
 660 665 670

His Gly Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser Thr Ala His Gly Thr Pro
 675 680 685

Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Thr Pro Ala
 690 695 700

Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser Ser Ala
 705 710 715 720

His Ser Thr Pro Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro
 725 730 735

Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Thr Pro Val
 740 745 750

Asp Ser Thr Ala His Gly Thr Pro Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala
 755 760 765

His Ser Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro
 770 775 780

Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Thr Pro Val
 785 790 795 800

Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala
 805 810 815

His Gly Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro
 820 825 830

Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala Asn Gly Thr Val Leu Ile Leu Pro
835 840 845

Asp Gly Ala Ala Leu Ser Thr Phe Ser Gly Gly Gly Leu Leu Leu Cys
850 855 860

Ala Cys Ala Leu Leu Leu His Val Phe Phe Thr Ala Val Phe Phe
865 870 875

<210> 12
<211> 62
<212> PRT
<213> Trypanosoma cruzi

<220>
<221> misc_feature <222> (20)..(20)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que tiene lugar de forma natural
<220>
<221> misc_feature <222> (31)..(31)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que tiene lugar de forma natural
<220>
<221> misc_feature <222> (44)..(44)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que tiene lugar de forma natural
<400> 12

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

Cys Cys Leu Xaa Ala Cys Thr Thr Ala Asn Gly Gly Ser Thr Xaa Ser
20 25 30

Thr Pro Pro Ser Gly Thr Glu Asn Lys Pro Ala Xaa Gly Glu Ala Pro
35 40 45

Ser Gln Pro Gly Ala Ser Ser Gly Glu Ala Glu Ala Ser Ser
50 55 60

<210> 13
<211> 68
<212> PRT
<213> Trypanosoma cruzi

<400> 13

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

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

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

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

Asp Phe Val Ala
65

<210> 14
<211> 227
<212> PRT
<213> Trypanosoma cruzi

<400> 14

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

Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe Gly Gln Ala Ala
20 25 30

Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Phe Val Ala
65

<210> 14
<211> 227
<212> PRT
<213> Trypanosoma cruzi

<400> 14

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

Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe Gly Gln Ala Ala
20 25 30

Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Ala Ala Glu Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe Gly Gln Ala Ala
165 170 175

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

Leu Ser Leu Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe
195 200 205

Gly Gln Ala Ala Glu Gly Asp Lys Pro Pro Pro Phe Gly Gln Ala Ala
210 215 220

Ala Gly Asp
225